



**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

**POLIMORFISMOS GENETICOS
DE LA RUTA ESTROGENICA
QUE INFLUYEN EN LA DURACION
DE LA VENTANA FERTIL
DE LA MUJER.**

DANIELA GALLIANO

Granada, 8 de Mayo de 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Daniela Galliano
D.L.: GR 2288-2009
ISBN: 978-84-692-3086-2

PROF. NICOLÁS MENDOZA LADRÓN DE GUEVARA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Doña Daniela Galliano, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: “POLIMORFISMOS GENETICOS DE LA RUTA ESTROGENICA QUE INFLUYEN EN LA DURACION DE LA VENTANA FERTIL DE LA MUJER”; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctora, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 17 de Abril de 2009

Fdo: Prof. Nicolás Mendoza Ladrón de Guevara

PROF. ALBERTO SALAMANCA BALLESTEROS, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Doña Daniela Galliano, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: "POLIMORFISMOS GENETICOS DE LA RUTA ESTROGENICA QUE INFLUYEN EN LA DURACION DE LA VENTANA FERTIL DE LA MUJER"; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctora, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 17 de Abril de 2009

Fdo: Prof. Alberto Salamanca Ballesteros

DR. ÁNGEL SANTALLA HERNÁNDEZ, DOCTOR ADJUNTO ESPECIALISTA DEL SERVICIO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “VIRGEN DE LAS NIEVES” DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Doña Daniela Galliano, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo mi dirección, el trabajo de tesis doctoral titulado: “POLIMORFISMOS GENETICOS DE LA RUTA ESTROGENICA QUE INFLUYEN EN LA DURACION DE LA VENTANA FERTIL DE LA MUJER”; finalizándolo con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctora, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 17 de Abril de 2009

Fdo: Dr. Ángel Santalla Hernández

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mi infinita gratitud y aprecio al Dr. Nicolás Mendoza, “estudioso de hormonas y escritor de contracultura y música”, que en estos años ha sido para mí una referencia profesional y personal: a él dedico un especial agradecimiento, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto, como por haberme brindado su amistad.

Al Dr. Alberto Salamanca, por su gentileza y sus constantes e inspiradas palabras de incentivo, que han supuesto un enriquecimiento para mi formación como profesional de la medicina y como persona.

Al Dr. Ángel Santalla, por sus consejos en los inicios de esta investigación.

Al Prof. Mario De Marchi, titular de Genética Clínica en la Universidad de Turín, por la colaboración que desde la Tesi di Laurea en Italia ha mantenido durante los años de Residencia y Doctorado en España y por su apoyo personal y científico a pesar de la distancia.

A Sabina Pérez, por su inestimable ayuda en el análisis y procesamiento estadístico de los datos obtenidos y por su infinita paciencia.

A los compañeros de los centros participantes en este estudio (H. Virgen de las Nieves de Granada, H. San Juan de Alicante, Clínica Sanatorio Bilbaíno, Clínica CEOGA de Lugo, Clínica Diatros de Barcelona) y a las casi 2000 pacientes sin cuya colaboración, anónima y desinteresada, esta tesis no hubiera sido posible.

A Pieri, hermana, cómplice y amiga, por los momentos y los sueños compartidos. Un especial agradecimiento a ella y a mis padres, incansables en sus visitas, mensajes, cartas y llamadas, por haberme apoyado incondicionalmente en todos los proyectos personales y profesionales de mi vida, soportando mi ausencia y mis descuidos: esta tesis es también vuestra.

A Francesca y Roberta, por su sincera amistad de tantos años y porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

A Paqui, Bea, Amparo y Marga, por el cariño y el apoyo que me han brindado en todo momento.

A Miguel Ángel, por haber estado a mi lado en los buenos y en los no tan buenos momentos de estos años en Granada que nunca olvidaré. Gracias de corazón por animarme siempre a continuar hacia delante y por recordarme “que todo llega”.

“Tal como ocurre en otras ciudades del mundo, incluso las del país natal, una persona al visitar un lugar siempre se lleva algo de ese sitio; como un acto majestuoso de comunión (común-unión), donde se deja un poco de lo que se tiene y se toma algo para sustituirlo. La magia estaba hecha. El contacto se había establecido. Nadie era ya el mismo. El encantamiento había surtido efecto”.

Gracias a todos por permitirme disfrutar de esta magia.

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo la mia infinita gratitudine e stima al Dr. Nicolás Mendoza, "studioso di ormoni e scrittore di controcultura e musica" che in questi anni è stato per me un riferimento professionale e personale: a lui dedico un ringraziamento speciale, per la fiducia che ha riposto in me per realizzare questo progetto e per avermi offerto la sua amicizia.

Al Dr. Alberto Salamanca, per la sua gentilezza e per le costanti ed ispirate parole di incentivo, che hanno supposto un arricchimento per la mia formazione come professionista della medicina e come persona.

Al Dr. Angel Santalla, per i suoi consigli all'inizio di questo lavoro di ricerca.

Al Prof. Mario Di Marchi, titolare di Genetica Clinica dell'Università di Torino, per la collaborazione che dalla Tesi di Laura in Italia ha mantenuto negli anni di Specializzazione e Dottorato in Spagna e per il sostegno personale e scientifico dimostratomi nonostante la distanza.

A Sabina Pérez, per il suo inestimabile aiuto nell'analisi statistico dei dati ottenuti e per la sua infinita pazienza.

Ai colleghi dei centri partecipanti in questo studio (H. Virgen de las Nieves di Granada, H. San Juan di Alicante, Clinica Sanatorio Bilbaíno, Clinica CEOGA di Lugo, Clinica Diatros di Barcellona), ed alle quasi 2000 pazienti senza la cui collaborazione, anonima e disinteressata, questa tesi non sarebbe stata possibile.

A Pieri, sorella, complice e amica, per i momenti e i sogni condivisi.

Un ringraziamento speciale a lei e ai miei genitori, instancabili nelle loro visite, messaggi, lettere e telefonate, per avermi appoggiato incondizionatamente in tutti i progetti personali e professionali della mia vita, sopportando la mia assenza e le mie disattenzioni: questa tesi è anche vostra.

A Francesca e Roberta, per la sincera amicizia di tanti anni e perché con loro le cose brutte si convertono in belle, la tristezza si trasforma in allegria e la solitudine non esiste.

A Paqui, Bea, Amparo e Marga, grazie per l'affetto e il sostegno che mi hanno sempre dato.

A Miguel Ángel, per essermi stato vicino nei buoni e nei non tanto buoni momenti di questi anni vissuti a Granada che non dimenticherò mai. Grazie di cuore per incitarmi sempre ad andare avanti e ricordarmi "que todo llega".

"Esattamente come capita in altre città del mondo, incluso del proprio paese, una persona quando visita un luogo si porta sempre via qualcosa da quello; come un atto maestoso di comunione (comune-union), dove si lascia un poco di ciò che si ha e si prende qualcosa di nuovo per sostituirlo. La magia era stata fatta. Il contatto si era stabilito. Nessuno era piú lo stesso. L'incantesimo aveva avuto effetto".

Grazie a tutti per avermi permesso di vivere questa magia.

A mia nonna,
che sarebbe stata orgogliosa di me.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
Definiciones. Confusión terminológica	12
Observaciones sobre Pubertad y Climaterio	16
Factores epidemiológicos que determinan la edad de la menarquia	18
Teorías fisiológicas de la pubarquia-menarquia.	
Factores epidemiológicos que determinan la edad de la menopausia	35
Razones o teorías antropológicas de la menopausia.	
Menopausia precoz o fallo ovárico prematuro	44
Factores genéticos que influyen en la presentación de la menarquia y la Menopausia	55
2. OBJETIVOS	62
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
4. RESULTADOS	74
Estadística descriptiva	75
Inferencia estadística	85
Características epidemiológicas.	90
Análisis de polimorfismos genéticos	94
Estudio de interacción génica: análisis digénico	116
5. DISCUSIÓN	175
Consideraciones generales	176
Factores ambientales	183
Factores genéticos	187
6. RIASSUNTO	201
7. CONCLUSIONES	208
8. BIBLIOGRAFÍA	213

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIONES. CONFUSIÓN TERMINOLÓGICA.

1.1. Sobre la Pubertad y la Menarquia:

a. Pubertad:

Entendemos por pubertad la etapa de transición entre la infancia y la edad adulta en la que se realizan los cambios morfológicos y funcionales del organismo que conducen al inicio de la fertilidad. La pubertad termina con la menarquia.

b. Menarquia:

El primer periodo menstrual de la mujer, que indica su madurez reproductiva. Suele ocurrir en los estadios finales de la pubertad, (estadio III-IV de Tanner), entre los 10 y 16 años.

c. Menarquia prematura:

La menarquia prematura aislada sin otros signos de maduración es una presentación sumamente rara de precocidad; es necesario considerar la posibilidad de infección, presencia de un cuerpo extraño, abuso sexual, traumatismo y neoplasias locales. El crecimiento, el desarrollo y la fertilidad normales no se ven afectados¹.

d. Adrenarquia prematura:

La aparición del vello púbico antes de los 6 años en las niñas negras y de los 7 años en las de raza blanca, consecuencia de un moderado incremento precoz de andrógenos suprarrenales.

e. Pubertad retrasada - Menarquia tardía:

Se define como pubertad retrasada la ausencia de cambios puberales a una edad igual a la edad media de su aparición normal en una determinada población, mas dos desviaciones de esa media².

Nos referimos a la menarquia tardía cuando ocurre alguna de las siguientes situaciones:

- Que no haya evidencia de sangrado uterino a los 16 años de edad, con características sexuales secundarias retrasadas, o a los 18 años independientemente del desarrollo sexual.
- Ausencia de sangrado uterino espontáneo, a pesar de haber alcanzado desde un año antes un estadio de desarrollo puberal de Tanner V o un desarrollo mamario desde 5 años antes.
- Ausencia de menstruación un año después de haber alcanzado la velocidad máxima de crecimiento.

La etiología es múltiple. El retraso puberal que cursa con menarquia tardía puede ser constitucional (idiopático), secundario a trastornos hipotalamohipofisarios que causan hipogonadismo hipogonadotropo (retraso fisiológico, pérdida de peso/anorexia, hipotiroidismo primario, hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de Cushing, carencia de GnRH, hipopituitarismo) y secundario a alteraciones gonadales que causan hipogonadismo hipergonadotropo (síndrome de Turner, Síndrome de Swyer, Disgenesia ovárica con cariotipo 46, XX)³.

1.2. Sobre el Climaterio y la Menopausia:

Climaterio y Menopausia son vocabolos en consonancia íntima, aunque no por ello sinónimos. Climaterio deriva de la palabra griega que significa escalera y es el *escalón* o periodo de la vida de una mujer que marca la transición de la edad fértil a la edad no fértil; en él concurren una serie de fenómenos endocrinos y psíquicos, donde sobresale la Menopausia, de los términos griegos *men* (mes) y *pausis* (cese), que define la interrupción del sangrado menstrual.

Climaterio es por tanto un amplio periodo de la vida de la mujer.

La Menopausia es un suceso puntual: la fecha de la última regla. Su valoración es necesariamente retrospectiva: han de pasar 12 meses sin menstruaciones para poder afirmar que ha ocurrido la menopausia, aunque para algunos son suficientes 6 meses sin menstruación⁴.

El comité científico de la OMS y la Sociedad Internacional de Menopausia (IMS) en su Primer Congreso Internacional celebrado en la Grande Motte (Francia) en 1976, acordó unas definiciones para evitar errores terminológicos, que mas tarde fueron aceptadas por la OMS en 1996 y por el Board de la Internacional Menopause Society en 1999, cuyo texto se incluye a continuación^{5 6 7 8}:

a. Menopausia (menopausia natural):

La menopausia, natural o espontánea, es el cese permanente de las menstruaciones debido a la pérdida de la actividad folicular del ovario. Se reconoce que la menopausia ha tenido lugar una vez que han transcurrido 12 meses consecutivos de amenorrea y cuando no hay otra causa evidente patológica o fisiológica para la misma. La menopausia ocurre con el último periodo menstrual, que solo es conocido con certeza de forma retrospectiva después de un año o más de la ultima regla. No existe un parámetro biológico independiente adecuado para su diagnostico.

b. Perimenopausia:

La perimenopausia incluye el periodo inmediatamente anterior a la menopausia, cuando comienzan los cambios endocrinos, biológicos y clínicos premonitorios de la menopausia y el primer año posterior la misma.

c. Premenopausia:

Abarca la totalidad del periodo reproductor hasta el último periodo menstrual.

d. Postmenopausia inmediata:

Este periodo transcurre desde la última menstruación hasta 1 año después.

e. Transición menopausica:

Es el periodo de tiempo antes del último periodo menstrual cuando la variabilidad en el ciclo menstrual normalmente aumenta.

Se define también como el periodo de tiempo entre la madurez sexual y reproductiva y la postmenopausia⁹.

f. Postmenopausia:

La postmenopausia se define como el periodo de tiempo que comienza a partir de la última menstruación, si bien no se puede determinar hasta que se hayan observado 12 meses de amenorrea espontánea, independientemente de si la menopausia fue inducida o espontánea.

g. Menopausia prematura o precoz:

La menopausia prematura o precoz debe definirse como aquella que ocurre a una edad inferior a la correspondiente a 2 desviaciones estándar por debajo de la edad media estimada para la población de referencia. Sin embargo, en la práctica, y en ausencia de estimaciones fidedignas de la distribución de la edad a la que ocurre la menopausia natural en los países en desarrollo, generalmente se utiliza la edad de 45 años como el punto arbitrario de corte, por debajo del cual se dice que la menopausia es temprana, y se deja el término de menopausia prematura para la que llega antes de los 40 años. Menopausia prematura e insuficiencia o fallo ovárico prematuro son frecuentemente utilizados como sinónimos.

h. Menopausia tardía:

En ausencia de estimaciones fidedignas de la distribución de la edad a la que ocurre la menopausia natural en los países en desarrollo, generalmente se utiliza la edad de 55 años como el punto arbitrario de corte, por encima del cual se dice que la menopausia es tardía.

i. Menopausia inducida o artificial:

La menopausia inducida se define como el cese de las menstruaciones secundario a la extirpación quirúrgica de ambos ovarios (con o sin histerectomía) -menopausia quirúrgica- o a la ablación iatrogénica de la función ovárica (por ejemplo por quimioterapia o por radiación). Con cierta frecuencia ocurre que en historias clínicas y en informes complementarios se utiliza la expresión menopausia quirúrgica para mujeres que han sido histerectomizadas pero que conservan uno o ambos ovarios. Es importante establecer fehacientemente si la ausencia de menstruación se debe sólo a la extirpación del útero, en cuyo caso la paciente presenta una amenorrea secundaria, o si

ella incluye la ovariectomía bilateral, en cuyo caso sí corresponde la denominación de menopausia quirúrgica o inducida por cirugía. En estos casos la fertilidad natural finaliza inmediatamente con la ablación de las gónadas femeninas. En los otros casos de menopausia inducida, especialmente con el uso de drogas oncológicas o radiación, la función ovárica puede ser irregular durante meses o incluso años y existe alguna posibilidad que, luego de un tiempo, la misma se recupere.

j. Síndrome climatérico:

El periodo en el que una mujer avanza de la etapa reproductora de la vida a los años postmenopáusicos, pasando por la transición perimenopáusica y menopausia. Es el conjunto de signos y síntomas provocados por el hipoestrogenismo, que acompañan la cesación de la función reproductora de la mujer.

1.3. Observaciones sobre Pubertad y Climaterio:

La actividad reproductiva, a diferencia de las demás funciones del organismo, está orientada hacia la perpetuación de la especie. No debe extrañar, por tanto, que sea operativa únicamente durante el período de la vida de mayor plenitud, cuando el organismo ha completado su crecimiento y desarrollo y, por otra parte, aún no ha entrado en una fase involutiva. En este capítulo se hará referencia a los períodos de transición que limitan la vida reproductiva: la pubertad y el climaterio. Ambos períodos se desarrollan de forma dinámica y progresiva, aunque están marcados clínicamente por dos hitos concretos: la fecha de la primera regla o menarquia y la de la última regla o menopausia.

Los mecanismos que regulan ambas etapas son diametralmente opuestos. En la pubertad, el sistema nervioso central recoge información sobre el proceso de madurez corporal y activa el eje reproductivo a medida que el individuo alcanza las fases más avanzadas del desarrollo. La ventaja más importante de este proceso de control reside en su reversibilidad. Si por alguna razón se producen alteraciones psíquicas, somáticas o ambientales que podrían comprometer el proceso reproductivo, los mecanismos de

neutralización se desencadenan de nuevo. De este modo se evita una situación crítica en la que los recursos sean requeridos simultáneamente tanto por el individuo como por un eventual embarazo. Desde que se tiene información, se sabe que la edad en que se presenta este período de transición ha avanzado progresivamente. Sin embargo, los cambios en las costumbres sexuales de las adolescentes y, en consecuencia, en su exposición a la patología, requieren del clínico un mejor conocimiento de esta etapa¹⁰.

El climaterio, por el contrario, va ligado a un elemento periférico: la dotación ovárica de células germinales, que es limitada y, dentro de ciertos límites, similar para cada individuo. El climaterio es considerado como un amplio periodo de la vida de la mujer, que separa dos épocas bien diferentes: la época de la madurez sexual con plena capacidad reproductiva y la época de la senectud. Durante el mismo, se pasa de una función ovárica normal y cíclica a una situación establecida y prolongada de fracaso definitivo de la función ovárica que se continúa hasta la senectud. Esta modificación de la función ovárica no es brusca sino paulatina y progresiva y está marcada por un fenómeno claro que es la pérdida de la menstruación o menopausia.

La postmenopausia ha adquirido en época reciente un protagonismo especial. Las razones son múltiples, pero se deben mencionar específicamente tres de ellas: la mujer tiene una mayor participación en los centros de decisión social y, en consecuencia, es capaz de requerir una mayor atención para sus problemas específicos; la reducción de la natalidad ha cambiado la morfología de la pirámide poblacional, con un aumento de la representación de los grupos de población de mayor edad; y, por último, todo ello adquiere mayor relevancia con el incremento de la esperanza de vida. El incremento constante de la esperanza de vida durante los últimos años en los países desarrollados, es un logro de los mejores cuidados en la salud. España e Italia son unos de los 35 países en los que la esperanza de vida es superior a los 80 años; en concreto, las mujeres españolas e italianas tienen una esperanza de vida de unos 83 años¹¹. Por otro lado, vivir muchos años no significa, necesariamente, vivir vidas más sanas. Varias encuestas revelan una proporción de discapacitadas entre las mujeres climatéricas que podría oscilar entre el 5% en la sexta década de la vida hasta el 20% por encima de los 85 años¹².

2. FACTORES EPIDEMIOLOGICOS QUE DETERMINAN LA EDAD DE LA MENARQUIA. TEORIAS FISIOLÓGICAS DE LA PUBARQUIA-MENARQUIA

2.1. La pubertad como transición.

Factores epidemiológicos que influyen en la menarquia.

La pubertad femenina, como periodo de transición entre infancia y edad adulta es la fase de la vida en la que se desarrollan las características sexuales secundarias hasta la manifestación completa del fenotipo femenino adulto, se produce el impulso del desarrollo de la pubertad, se alcanza la fertilidad y se acompaña de profundas modificaciones psíquicas¹³.

Todas estas modificaciones son el resultado de la supresión de estímulos nerviosos centrales inhibidores sobre la hormona liberadora de hormona luteinizante hipotalámica (LHRH), dando lugar a una secreción episódica y con ella, a una liberación pulsátil de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH)¹⁴.

La elevada amplitud y frecuencia de secreción pulsátil de gonadotropinas tiene como consecuencia un claro aumento de la concentración plasmática de los estrógenos¹⁵.

Estudios de gemelas idénticas y no idénticas indican que la edad de la menarquia esta controlada principalmente por factores genéticos cuando el entorno es óptimo¹⁶. Un mecanismo para la influencia genética está relacionado con las alteraciones de la actividad o la exposición a los estrógenos, por ejemplo, a causa de cambios sutiles en la estructura de los receptores estrogénicos. Se conocen desde hace años polimorfismos específicos del gen del receptor alfa estrogénico asociados a una diferencia en la edad de la menarquia¹⁷. La menarquia temprana se ha asociado a un polimorfismo A2 del gen CYP17 que controla la biosíntesis de andrógenos y de niveles elevados de estrógenos séricos¹⁸. Es posible que una cascada de genes determine las variaciones en el tiempo del inicio de la pubertad. Características étnicas y raciales son factores genéticos que contribuyen en la

variaciones de la edad de inicio puberal y en producir precocidad sexual en niñas emigrantes.

A pesar de que el determinante principal del desarrollo cronológico de la pubertad es genético, otros factores influyen en el momento del inicio y la velocidad de progresión de la pubertad: localización geográfica, exposición a la luz, salud general y nutrición, así como factores psicológicos¹⁹. Por ejemplo, las niñas con antecedentes familiares de pubertad precoz tienen antes su pubertad²⁰.

Los factores ambientales son importantes al principio de la pubertad. Las niñas que viven más cerca del ecuador y a menores altitudes, las de zonas urbanas y las ligeramente obesas empiezan antes que las de latitudes nórdicas, las que viven a mayor altitud con respecto al nivel del mar, las de zonas rurales y las de peso normal, respectivamente. Con respecto al efecto del clima, de la luz y de la oscuridad, llama la atención que las niñas ciegas tengan menarquia más temprana^{21 22}, al igual se da más en invierno que en verano, demostrando un posible efecto inhibitorio de la foto estimulación. Sin embargo en el ártico en los meses fríos se reduce el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y la reproducción. Los efectos de luz-oscuridad podrían estar mediados por la glándula pineal, a través de la producción de melatonina, la que circula en mayores concentraciones en la noche.

Existe una clara relación entre los momentos cronológicos de la menarquia de madres e hijas y entre hermanas¹⁰, así como una relación entre la edad del inicio y la duración de la pubertad; cuanto antes sea el principio, más larga será la duración²³.

La mejora de las condiciones de vida y de nutrición materna antes del nacimiento, y en las niñas después de este ha sido importante en el desarrollo de niñas más altas, con mayor peso y maduración más temprana²⁴.

La desnutrición intrauterina facilitaría la producción de pubertades más tempranas en la adolescencia²⁵. En España las niñas con un peso de nacimiento menor de 2.7 Kg. tenían la menarquia un año más temprano y en Israel la edad de menarquia de niñas que tuvieron retraso del crecimiento intrauterino era 1.3 años más temprana²⁶.

El peso corporal aumenta al crecer. Durante la pubertad se producen importantes cambios en la composición corporal, aumentando más la masa grasa en mujeres y la masa muscular en varones.

Frisch y Revelle mostraron que había una relación entre el peso corporal y la edad de inicio de la pubertad, concluyendo que se necesita una cierta cantidad de grasa corporal para iniciar la pubertad²⁷. Frisch señaló que toda niña debe alcanzar un peso corporal crítico (47,8 Kg.) antes de iniciar la menarquia²⁸. Anderson y cols²⁹ comunicaron que la edad de menarquia más temprana en USA se asocia a un mayor IMC. El estudio de Bogalusa Heart Study³⁰ de niñas estudiadas entre 1992 y 1994, en las que la edad media de menarquia fue 11.4 y 11.5 años en americanas africanas y blancas respectivamente, indicaría una combinación de factores ambientales y étnicos.

Posiblemente más importante que el peso total sea el cambio de la composición corporal hacia un mayor porcentaje de grasa (desde el 16% al 23,5%), que a su vez resulta influido por el estado de nutrición³¹. En efecto, las niñas moderadamente obesas (un 20%-30% por encima del peso normal) tienen antes la menarquia que las del peso normal³². En cambio, las anoréxicas y las que hacen un ejercicio intenso presentan retraso de la menarquia o amenorrea secundaria. Que existen otros factores implicados lo pone de manifiesto el retraso de la menarquia de las niñas con obesidad mórbida (con un sobrepeso superior al 30%), las diabéticas y las de peso normal que hacen un ejercicio intenso.

Existe una clara relación entre la disponibilidad de combustibles metabólicos y la función reproductiva en animales, lo que es una evidencia que el comienzo de la pubertad tendría que ver con la adquisición de una determinada reserva metabólica y que el desarrollo puberal más temprano observado en niñas americanas parece estar relacionado con el aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad. Dado que la disponibilidad de alimentos y energía influencia la maduración sexual, y que la distribución mundial de los alimentos es desigual, es esperable la variación importante del desarrollo puberal encontrada en el mundo sólo por esta variable.

Tanto el déficit como el exceso de nutrientes alteran el tiempo de la pubertad, a mayor déficit más tardío y a mayor exceso más temprano.

La desnutrición calórico-proteica tiene una alta prevalencia en países subdesarrollados. Habitualmente este tipo de desnutrición se produce en los primeros meses de vida, en relación con el término temprano de la lactancia materna, cuando el lactante se expone a un aporte globalmente disminuido de nutrientes a consecuencia de bajos conocimientos de su familia de lo que es una alimentación adecuada o por incapacidad económica de adquirir los alimentos mínimos necesarios para el niño. A esta situación se agrega un ambiente altamente contaminado del punto de vista bacteriológico³³.

La pérdida progresiva de peso empieza a alterar algunas funciones, entre ellas la inmunológica, facilitando aun más las infecciones, las que deterioran rápidamente el peso corporal. Como mecanismo de compensación y de sobrevivencia, el niño deja de crecer y lentifica su maduración ósea. Si el retraso de edad ósea no se recupera en los que superan la etapa aguda de la desnutrición, produce una partida mas tarde de la pubertad, dada la correlación existente entre edad ósea y edad del inicio puberal³⁴.

Niñas subalimentadas retrasan la pubertad. Las niñas emigrantes tienen con mayor frecuencia problemas de malnutrición que superan al llegar a países desarrollados, presentando una sobre aceleración estatural y puberal. Esto hace pensar que eventos hormonales relacionados con la sobre aceleración del crecimiento puede condicionar una maduración hipotalámica que conduzca a pubertad. Este acondicionamiento hipotalámico podría ocurrir a una edad crítica específica ya que la menarquia precoz es más común en niñas indias que llegaban a Suecia entre 3 y 6 años más que las que llegaban antes de los 2 años³⁵. Proos describió en niñas extranjeras adoptadas, una menarquia mas temprana que se correlaciona con mayor edad al emigrar y mayor sobre aceleración de crecimiento y peso después de emigrar³⁶.

No todos los estudios auxológicos han detectado una relación entre el inicio de la pubertad y la masa o la distribución de la grasa corporal^{37 38}. No obstante, la identificación de la leptina he revitalizado la importancia de una relación entre la grasa corporal y la reproducción. La leptina es un péptido secretado en el tejido adiposo que actúa sobre el sistema nervioso central que regula la conducta alimentaría. Las concentraciones de leptina aumentan hasta el inicio de la pubertad, lo cual indica que para que comience la pubertad se necesita un umbral de concentración de leptina (y, por tanto, una cantidad

critica de tejido adiposo, la fuente de la leptina)³⁹. Cuanto mas elevada sea la concentración de leptina, antes aparecerá la menarquia⁴⁰. Las chicas con pubertad precoz idiopática tienen concentraciones más elevadas de leptina⁴¹. Las concentraciones de leptina disminuyen conforme se sobrepasan los estadios de Tanner de la pubertad⁴². Puede que la leptina no sea el factor metabólico que pone en marcha la pubertad, pero es un componente de este complejo proceso y refleja la importante relación entre la nutrición y la reproducción⁴³.

Es interesante señalar que en USA, la edad de la telarquia se ha adelantado, no así la de la menarquia; esto indicaría que existe un mayor tiempo entre la telarquia y la menarquia, lo que es contradictorio con lo descrito en otros países como Holanda y Suecia, que presentan una tendencia secular a adelantar el tempo de la pubertad. Por otra parte, otros factores ambientales no identificados podrían producir un desarrollo mamario adelantado sin afectar la edad de la menarquia⁴⁴. En Francia y en los países mediterráneos, la edad media de la menarquia es menor que en otros países de Europa occidental, lo que según Eveleth y cols⁴⁵ señalaría diferencias geográficas dadas por factores genéticos, étnicos y ambientales. Algunos países subdesarrollados presentan una tendencia secular a disminuir la edad de inicio puberal por cambios en los estándares de vida: Nigeria y Guatemala, por ejemplo, tienen la edad de menarquia mas tarde que en Chile y en Venezuela. En algunas zonas de China y Senegal la edad media de la menarquia superar los 16 años. El coeficiente de variación es mayor en niñas de nivel bajo de Camerún que en las de nivel alto, lo que demuestra la importancia del nivel socioeconómico y condiciones nutricionales en el tempo de la pubertad. De la mitad del siglo XIX a la mitad del siglo XX el promedio de edad de menarquia disminuyó de 17 a 14 años en USA y países de Europa Occidental⁴⁶. Una disminución de 0.3 años por década se produjo en Finlandia y Noruega. En Francia disminuyó 0.18 años por década entre 1841 y 1974⁴⁷. Estudios en el Reino Unido, Suecia y Bélgica posteriores a 1960, muestran solo una discreta disminución de la edad de menarquia (0.14, 0.05 y 0.03 años por década respectivamente), señalando que la tendencia secular se está deteniendo. En España aún es marcada, con 0.22 años por década durante los 1990⁴⁸.

En varios países europeos la edad de menarquia ha dejado de disminuir y se ha estacionado en alrededor de 13 años. Este cese de disminución en la edad de maduración ha ocurrido también en los varones holandeses desde 1980, tomando como parámetro el volumen testicular⁴⁹.

Las enfermedades crónicas de todos los sistemas del organismo, como las gastrointestinales, pulmonares, cardíacas, hepáticas, o endocrinas entre otras, influyen en la edad de la menarquia, ya que llevan a una menor velocidad de crecimiento, retraso de la maduración ósea con retraso en la edad de inicio y progresión del desarrollo puberal. El mecanismo por el cual producen el retraso de la edad ósea y de la pubertad varía de acuerdo a las patologías. Las enfermedades gastrointestinales lo hacen por desnutrición, por anorexia o pérdida de nutrientes por vómitos, diarrea o mala absorción intestinal; las enfermedades pulmonares por hipoxia crónica de los tejidos y por déficit nutricional por anorexia e infecciones repetidas, con mayores requerimientos de nutrientes que no son compensados; las enfermedades renales crónicas por acidosis, poliuria y desnutrición por infecciones repetidas. Enfermedades agudas y crónicas, condiciones físicas y psicológicas adversas, deprimen el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. El entrenamiento físico intenso y competencia deportiva como en las gimnastas de elite pueden retrasar la pubertad. En tiempos de guerra se retrasa la menarquia en la que influyen factores nutricionales, psicológicos y emocionales.

Los disruptores químicos endocrinos, sustancias ambientales ampliamente distribuidas, introducidas por el hombre, pueden influir negativamente en el sistema endocrino. Pueden producir desordenes en la diferenciación sexual humana, en órganos reproductivos y cánceres hormono-dependientes⁵⁰.

El DDT (diclorodifeniltricloroetano) actúa como antagonista de estrógenos y antagonista de andrógenos. El plomo se asocia a retraso en desarrollo mamario y de vello púbico en niñas negras americanas. La migración podría interrumpir la exposición de efectos negativos sobre esteroides sexuales.

Es conocido que la talla de los adultos es un reflejo de las condiciones de vida que tuvieron durante la niñez. Las condiciones de vida en muchos países han mejorado durante el último siglo y medio, lo que se refleja en que la población crece mas, siendo la tendencia secular del crecimiento un buen marcador de la salud pública poblacional.

El incremento en la estatura de los adultos ocurre desde el siglo XIX, para lo cual existe la información de conscriptos en Holanda, que han ido mejorando su estatura a través de los años⁵¹. Así, los holandeses han crecido de 165 cm. a 181 cm. de 1860 a 1990, siendo actualmente la nación mas alta del mundo, promediando los varones 184 cm. y las mujeres 171 cm.⁵²

En el siglo XVIII la talla promedio disminuyó producto de las pobres cosechas, altos precios de los granos, lo que produjo una mala nutrición en los niños⁵³. Por otra parte la cifra de aumento de talla no es pareja; aumenta más en el siglo XX que en el XIX y más después de la segunda guerra mundial en los holandeses⁵⁴. En los últimos años la talla ha aumentado solo 3 mm/década en los escandinavos y 3 cm./década en Europa oriental. Mientras en Escandinavia la estatura promedio ha llegado a un plateau, en otros países sigue aumentando⁵⁵. En USA la talla promedio de los varones es de 177 cm. y de las mujeres de 163 cm. (7 cm. menos que en Holanda). La tendencia secular ha sido menor, aumentando la diferencia de estatura de acuerdo al género⁵⁶.

La tendencia secular en los niños ha sido en espejo con la de los adultos. A medida que mejoran las condiciones ambientales se adelanta la pubertad y la curva de crecimiento se desplaza a la izquierda. El aumento es mayor hacia la pubertad, así aumentan 1 cm. por década a edades tempranas y 3 cm. por década a edades mas tardías. Sin embargo la longitud al nacer ha cambiado poco en los japoneses⁵⁷.

El aumento de talla de los adultos ocurre especialmente por aumento de talla en los primeros 2 años de vida. Este aumento se debe primordialmente a un aumento de la longitud de las extremidades inferiores, lo que se refleja en un cambio en la relación talla sentado entre talla parado⁵⁸.

Todos estos factores epidemiológicos señalan que una mejor nutrición de la población mundial y una mejor prevención de los factores ambientales que

alteran la edad de inicio de la pubertad, permitirán una expresión mas adecuada de la información genética que todo ser humano trae consigo desde el momento de la concepción.

2.2. Fisiología de la pubertad femenina.

2.2.1 Periodo de la lactancia y la niñez.

La activación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (figura 1)^{59 60} al comienzo del desarrollo de la pubertad femenina no constituye ningún acontecimiento nuevo. Debe considerarse más bien como una fase de transición con reanudación de una actividad aumentada. Una primera activación tiene lugar en la fase inicial y media de la gestación y en el período neonatal. En el desarrollo embrionario precoz se produce la emigración de neuronas secretoras de LHRH desde la región de las placas olfatorias al hipotálamo. Hasta la 16 semana fetal, dichas neuronas han establecido conexión en el sistema capilar portal del hipotálamo e hipófisis⁵. Desde etapas precoces de la vida intrauterina se puede por tanto detectar actividad del eje hipotálamo-ovárico: hacia la mitad de la gestación se puede demostrar una secreción LHRH pulsátil. En un estrecho margen de tiempo aumenta el contenido de gonadotropina del lóbulo anterior de la hipófisis. Ambas gonadotropinas, la hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) son excretadas en cantidades crecientes como respuesta al estímulo de LHRH hipotalámica⁵, alcanzando valores plasmáticos típicos de la edad adulta a mitad de la gestación, pero disminuyen luego conforme se eleva la concentración de las hormonas esteroideas durante el embarazo, que ejercen una retroalimentación negativa o inhibitoria⁶¹. Después del parto, y coincidiendo con la desaparición de los esteroides placentarios, se observa en la recién nacida un incremento temporal, tanto de las gonadotropinas como de los esteroides ováricos circulantes. Durante el primer año de vida, en la niña puede registrarse la actividad del marcapasos hipotalámicos, que se refleja en pulsos horarios de gonadotropinas, especialmente FSH, e incrementos correspondientes del estradiol, sin que se alcancen fases avanzadas de desarrollo folicular.

En el curso del segundo año de vida los valores de gonadotropinas y esteroides descienden hasta niveles muy bajos. Los pulsos de gonadotropinas, secundarios a los de GnRH, son muy poco frecuentes y de baja intensidad. Esta disminución en la actividad del bloque central se atribuyó inicialmente de forma exclusiva a una mayor sensibilidad de las células productoras de GnRH al freno de los esteroides ováricos. Sin embargo, la reducción de las gonadotropinas de un lactante no se debe por completo a la gran sensibilidad a la retroalimentación negativa. La causa de la alta sensibilidad del mecanismo de retroalimentación negativo a pequeñas concentraciones de estrógenos circulantes en la fase de reposo prepuberal es desconocida. El hecho de que también en pacientes agonadales de entre 4 y 10 años de edad puedan descender a niveles muy bajos las concentraciones inicialmente elevadas de gonadotropina, aunque falten totalmente los esteroides gonadales constituye un indicio de la existencia de influencias inhibitoras nerviosas centrales independientes de los esteroides⁶².

Las observaciones clínicas en pacientes con tumores del sistema nervioso central apoyan la hipótesis de la existencia de vías neuronales inhibitoras de la pubertad en el hipotálamo posterior, que actúan suprimiendo el generador pulsátil LHRH. Investigaciones con N-metil-D-aspartato (NMDA) indican que los receptores de glutamato y aspartato localizados en el hipotálamo tienen un papel en la regulación de la actividad del generador pulsátil hipotalámico LHRH. En estudios en primates pudo demostrarse que la administración intermitente de NMDA puede desencadenar una pubertad precoz y una activación completa del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, un efecto que bloquean los antagonistas de los receptores de NMDA⁶³.

Ello nos explica que, tanto la fase de reposo prepuberal como también el comienzo de la pubertad en jóvenes, no está controlado por el generador pulsátil hipotalámico de LHRH, sino por centros superiores.

Para explicar esta situación se ha establecido la teoría del «inhibidor intrínseco», según la cual el sistema generador de pulsos de GnRH en el núcleo arcuato estaría bloqueado por un factor inhibitor procedente del sistema nervioso central. Probablemente no se trate de una sustancia única y específica, sino de la acción simultánea y coordinada de varios elementos que

participan en el control de las células secretoras de GnRH, entre los que cabe destacar los opiáceos endógenos, la melatonina o los neurotransmisores.

Esta situación de bloqueo se mantiene hasta los 8 años de edad. En estos momentos la sensibilidad del sistema hipotálamo-hipofisario disminuye de forma progresiva, y se precisan cantidades cada vez mayores de esteroides periféricos para mantener la secreción de gonadotropinas. Sobre estas evidencias, Grumbach y Kaplan establecieron la teoría del gonadóstato, según la cual el sistema regulador del marcapaso hipotalámico actuaría como un servomecanismo que precisaría cantidades cada vez mayores de esteroides gonadales para cerrar el circuito⁶⁴. Sin embargo, el concepto de una disminución espontánea en la sensibilidad a los estrógenos de las células neurosecretoras de GnRH como consecuencia de un proceso de «maduración» está cada vez más desprestigiado. Actualmente se tiende a complementar las teorías del «gonadóstato» con las que preconizan una disminución progresiva del «inhibidor intrínseco».

2.2.2. Periodo prepuberal. Adrenarquia.

Alrededor de los 8 años, dos antes de que se active el eje hipofiso-gonadal, se detecta un incremento en los niveles circulantes de andrógenos de origen suprarrenal. Especialmente, deshidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS). Histológicamente puede detectarse un cambio en la composición de la corteza suprarrenal, con un incremento progresivo de la importancia de la zona reticular y un aumento de la concentración de enzimas relacionadas con esteroidogénesis, en especial la 17-hidroxilasa y la 17-20-desmolasa⁶⁵. Estos niveles elevados se mantienen hasta prácticamente los 15 años de edad. La acción directa de estos andrógenos o de sus metabolitos periféricos más potentes (androstendiona y testosterona) provoca el desarrollo del vello axilar y pubiano, una de las primeras manifestaciones puberales. Este período se ha denominado adrenarquia (o pubarquia). De manera ocasional puede observarse una adrenarquia prematura aislada, es decir, aparición de vello púbico y axilar sin ningún otro signo de desarrollo sexual.

No se conoce el mecanismo de regulación del cambio en la producción de andrógenos suprarrenales. Por el contrario, no se han detectado cambios en

la concentración de ACTH o cortisol, por lo que se supone que las modificaciones en la síntesis suprarrenal de andrógenos se deben a la acción de un hipotético factor estimulador de los andrógenos suprarrenales (FEAA), que nunca ha sido identificado y que podría ser un fragmento específico de la proopiomelanocortina (POMC). Se ha identificado una glucoproteína de gran tamaño que también da muestras de actividad suprarrenal estimuladora de andrógenos. Sin embargo, un estudio demostró que todos los péptidos relacionados con la proopiomelanocortina, como la ACTH, la betaendorfina y la betalipotropina, no ejercían una función determinada en la iniciación de la adrenarquia⁶⁶. Otros estudios tampoco han podido demostrar una relación entre la secreción de melatonina y la adrenarquia⁶⁷.

Parece de rigor indicar que los factores que controlan la adrenarquia siguen estando poco claros, pero puede que se trate simplemente de un grado de maduración, de un proceso que requiere del periodo completo de la infancia.

Con independencia de su relación con la adrenarquia, los factores que inducen la gonadarquia al final de la prepubertad implican la disminución de la inhibición del gonadóstato del sistema nervioso central (SNC)-hipófisis, la progresiva sensibilidad de la adenohipófisis a la GNRH exógena (y probablemente endógena) y la reactividad de los folículos a la FSH y a la LH.

Durante aproximadamente 8 años, desde el principio de la infancia a la prepubertad, la LH y la FSH permanecen inhibidas en concentraciones muy bajas. Los mecanismos de esta inhibición son una retroalimentación negativa sumamente sensible de concentraciones bajas de estrógenos gonadales sobre el hipotálamo y la hipófisis, y una influencia inhibitoria central intrínseca sobre la GNRH, que reduce las concentraciones basales de gonadotropinas incluso en niñas que carecen de gónadas.

Mientras que al principio de la infancia la inhibición por retroalimentación negativa puede ejercer la función más importante, el inhibidor intrínseco central se vuelve dominante a mitad de la infancia hasta la prepubertad. En la patogenia de la pubertad precoz secundaria a lesiones hipotalámicas se ha propuesto la supresión o el daño de la fuente nerviosa de esta inhibición⁶⁸. Así, el momento puberal normal de la gonadarquia, con la reactivación y la síntesis

de las gonadotropinas, se debe a la asociación de la reducción de la supresión intrínseca de GnRH y de la menor sensibilidad a la retroalimentación negativa de los estrógenos⁶⁹. Dos neuroseñales parecen implicadas en el freno limitador sobre la secreción de GnRH, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el neuropéptido Y. Una reducción de la liberación hipotalámica de (GABA) y de neuropéptido Y acompaña al inicio de la pubertad femenina y un antagonista del neuropéptido Y puede inducir la liberación precoz de GnRH en el mono^{70 71}.

Aunque el momento de presentación del desarrollo puberal puede estar relacionado con numerosos factores como los antecedentes genético-familiares, la localización geográfica o los niveles socioeconómicos, es lógico suponer que todos estos elementos están mediados por un factor común. Son dos las hipótesis que explican la disminución progresiva de la inhibición intrínseca y el desbloqueo progresivo del gonadostato: una considera la existencia de un reloj biológico natural capaz de percibir el transcurso del tiempo y decidir el momento en el que desaparece el efecto neutralizador o se desencadena un efecto estimulante⁵⁷, y la otra se basa en la coherencia de que la actividad reproductiva tan sólo se inicia cuando se ha completado el crecimiento y desarrollo. Por tanto, un indicador metabólico informa al gonadostato cuándo se ha alcanzado una etapa determinada de madurez.

Los estudios experimentales realizados en primates no han podido demostrar una influencia específica de tipo supraquiasmático en el desencadenamiento de la pubertad. Las evidencias más sugestivas se refieren a un posible control a través de la glándula pineal. Se ha señalado que la supresión de la inhibición intrínseca central se debe a la reducción de la secreción de melatonina por la glándula pineal. Los niveles basales de melatonina circulante y la importancia de los pulsos que constituyen un incremento nictemeral disminuyen sensiblemente con la aparición de la pubertad y se incrementan de nuevo en los casos de amenorrea hipotalámica. Sin embargo, la importancia de estos hechos está discutida, argumentándose que puede tratarse más de una consecuencia que no de la causa de la actividad del eje gonadal. Mientras que la melatonina puede intervenir en la alteración del desarrollo cronológico de la pubertad que se asocia a los tumores pineales y en la fisiopatología de la pubertad precoz central, no existen pruebas en apoyo de que sea importante en el inicio fisiológico de la pubertad normal⁷².

Por esta razón, cada vez gana más partidarios la idea de un indicador metabólico que actuaría desbloqueando el gonadóstato y disminuyendo de forma progresiva su sensibilidad a los estrógenos. Como se ha mencionado antes, Frisch observó una clara correspondencia entre la aparición de la menarquia y el momento en el que se alcanza un índice determinado de masa corporal. Desarrollando estas observaciones halló también una correlación entre la evolución ponderoestatural y la velocidad de crecimiento. Ello la llevó a formular la teoría del “peso crítico”, según la cual no se presenta la menarquia si no se alcanza un peso cercano a los 47 Kg. y una talla media de 160 cm. Más adelante se formuló una correlación más precisa entre la edad de la menarquia y una proporción adecuada entre peso graso y peso magro²².

Durante la infancia el mecanismo de feed-back negativo estaría bloqueado por un conjunto de mediadores del sistema nervioso central, entre las que destacan los opiáceos y los neurotransmisores. El crecimiento estrictamente vegetativo conduce a un desarrollo progresivo que favorece la actividad episódica de varias hormonas hipofisarias, entre ellas la hormona de crecimiento, las gonadotropinas y posiblemente la TSH. Con ello se entra en un proceso en espiral que facilita la redistribución de la masa corporal, el crecimiento estatural, el desarrollo fenotípico de los caracteres sexuales secundarios y finalmente la menarquia. Es posible que existan factores como el ejercicio excesivo, la restricción alimentaria o el estrés psíquico, capaces de bloquear este proceso madurativo por varias vías, mientras que situaciones como la obesidad mórbida no se acompañan de actividad menstrual, pero no por un bloqueo directo de la actividad hipotalámica sino por la acción aromatizadora periférica de la masa adiposa⁷³.

Los andrógenos suprarrenales y, en menor grado, la secreción gonadal de andrógenos causan el crecimiento del vello axilar y púbico. La adrenaquia tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento esquelético. A pesar de que esta relacionada temporalmente con la gonadarquia, la adrenaquia es un acontecimiento biológico independiente, sin relación alguna desde el punto de vista funcional.

2.3. Pubertad.

Cambios del medio hormonal.

En la prepubertad tardía se modifica de nuevo la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Por una parte, disminuyen las influencias inhibitoras del sistema nervioso central sobre el generador pulsátil de LHRH; simultáneamente, la sensibilidad del sistema de retroalimentación negativo hipotálamo-hipofisario sobre los estrógenos circulantes se hace menor: la misma concentración de estrógenos produce ahora una inhibición más débil de la liberación de gonadotropinas. Dichas modificaciones conducen inmediatamente a una mayor amplitud y frecuencia de la liberación de LHRH hipotalámica, que es seguida de un aumento de la secreción pulsátil de LH y FSH. Esto se demuestra inicialmente sólo durante el sueño⁷⁴, pero de forma gradual se extiende el día. Una mayor sensibilidad de las células gonadotropas del lóbulo anterior de la hipófisis frente a la LHRH se puede observar también por el aumento en la liberación de ambas gonadotropinas después de la administración de LHRH en el *test de LHRH*.

Conforme los estrógenos de las gónadas aumentan (gonadarquia), se producen las modificaciones externas de las características sexuales secundarias hacia un fenotipo adulto femenino: el desarrollo mamario, la distribución femenina de la grasa, el crecimiento vaginal y uterino.

En general, el primer signo de pubertad es una aceleración de crecimiento, seguida del brote de las mamas (telarquía). Aunque la secuencia puede invertirse, la adrenarquía suele aparecer después del brote mamario con aparición del vello axilar dos años después. En un 20% de las niñas, el crecimiento del vello púbico es el primer signo de pubertad.

El crecimiento esquelético aumenta con rapidez como resultado de la secreción gonadal inicial de bajas concentraciones de estrógenos, que incrementan la secreción de somatotropina, la cual a su vez estimula la producción de IGF-I⁷⁵.

El aumento de tamaño y modificaciones de la estructura interna de ambos ovarios, así como el aumento de tamaño y la configuración del útero, tiene una correlación temporal con el aumento de la concentración plasmática de estradiol.

Hacia la mitad de la pubertad, una secreción gonadal suficiente de estrógenos induce la proliferación del endometrio, y aparecen las primeras menstruaciones. La menarquia es un acontecimiento tardío, que ocurre una vez sobrepasado el pico de crecimiento. Hay indicios de que las niñas que experimentan primero la telarquia tienen una menarquia más temprana y mayor cantidad de grasa corporal, lo cual indica que podrían correr un mayor riesgo de obesidad en la edad adulta⁷⁶.

Los ciclos posteriores a la menarquia son inicialmente anovulatorios: en los primeros dos años después de la menarquia, el 55 hasta el 90% de todos los ciclos son anovulatorios y este porcentaje sólo 5 años después de la menarquia desciende a un 20%⁷⁷. Entre la etapa que transcurre desde la mitad hasta el final de la pubertad, se establece la maduración de la relación de retroalimentación positiva entre el estradiol y la LH, lo cual conduce a los ciclos ovulatorios⁷⁸. Las respuestas ininterrumpidas y predecibles de picos de LH al estradiol con ovulación son por lo tanto acontecimientos puberales tardíos.

2.4. Diagnóstico

La medida de la concentración de estradiol en una única muestra de plasma es poco adecuada para la detección del comienzo de la pubertad.

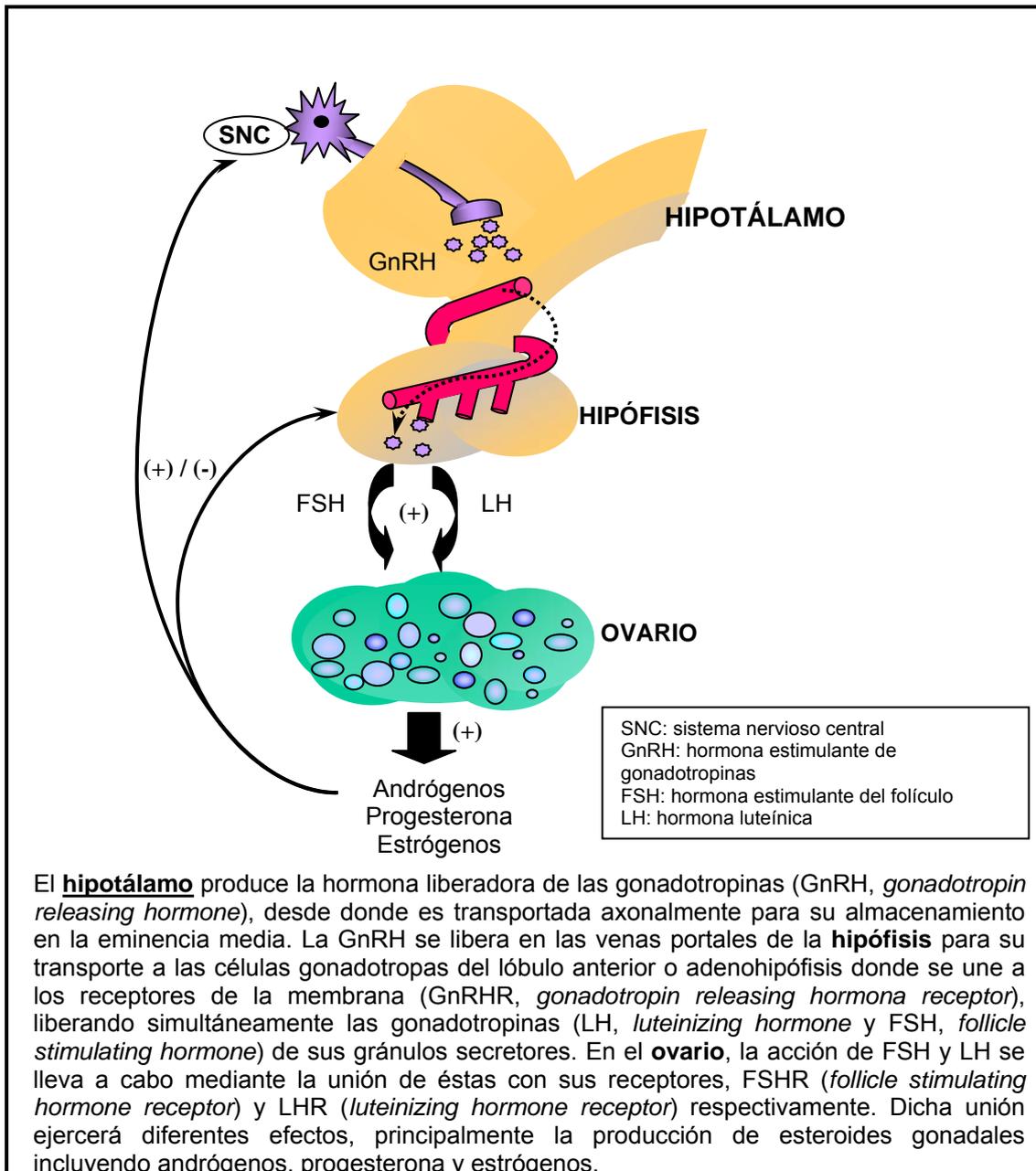
La mayoría de ensayos radioinmunológicos (RIA) que se obtienen comercialmente para la medida del estradiol plasmático funcionan sin extracción o separación cromatográfica de otros esteroides potencialmente "interferentes". Muchos ensayos radioinmunológicos, por su amplitud limitada de medición, están pensados más bien para la medicina de la reproducción en mujeres adultas: en la gama de las concentraciones de estradiol pediátricas muestran una sensibilidad insuficiente. También el carácter episódico de la liberación de estradiol en el momento del comienzo de la pubertad requiere la medida de la concentración de estradiol de varias muestras sanguíneas extraídas secuencialmente.

El test LHRH proporciona mejor información sobre si el sistema hipotálamo-hipófisis-ovario ha alcanzado un estado de pubertad madura. Junto a un incremento absoluto del aumento de las gonadotropinas después de la inyección de LHRH, en la pubertad recién iniciada encontramos un cociente

LH/FSH después de la estimulación, de 1,0⁷⁹. Como la concentración de estradiol, también las concentraciones de gonadotropinas dependen en gran manera del ensayo; además existe una influencia de la dosis elegida de LHRH sobre la excreción de gonadotropina. Cada pediatra o ginecólogo que se ocupa del diagnóstico de trastornos de la pubertad, debe establecer, como base, valores normales propios según el método utilizado para una evaluación correcta.

La demostración de secreción nocturna aumentada de gonadotropina, puede preceder en el tiempo a una reacción puberal en el test de LHRH y debe considerarse como el signo más precoz de un incipiente desarrollo de la pubertad⁶⁶.

La investigación de la concentración de 24 horas de gonadotropinas tiene una importancia sólo secundaria para el diagnóstico de la madurez sexual precoz.

Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovárico^{59 60}.

3. FACTORES EPIDEMIOLOGICOS QUE DETERMINAN LA EDAD DE LA MENOPAUSIA. RAZONES O TEORIAS ANTROPOLOGICAS DE LA MENOPAUSIA.

3.1. Factores que influyen en la edad de la menopausia

En el siglo VI, Aetius de Amida decía que la menstruación no cesaba antes de los 35 años y que por lo general no continuaba después de los 50 años. Notó que las mujeres con sobrepeso perdían sus períodos muy pronto y atribuía a la edad, los hábitos y las características de la mujer, así como la estación del año, la alimentación y la presencia de enfermedades el que el período fuera normal, anormal, aumentase o disminuyese.

Según los datos de la encuesta encargada por la Asociación Española para el estudio de la Menopausia (AEEM), en España la edad promedio en que se produce la menopausia es a los 47 años (www.aeem.es). Esta edad es algo inferior que la que encuentra el Grupo Científico de la OMS para el mundo occidental que da una media de unos 50 años.

Los factores que pueden influir sobre la menopausia son:

a. Herencia

Se ha observado que frecuentemente ocurre a una edad aproximada en una misma familia.

b. Raza y clima

Las razas mediterráneas y africanas suelen tener la menopausia a edades más bajas que las razas nórdicas. También hay un informe que las mujeres que viven en altitudes elevadas (más de 2.000-3.000 m) parecen tener la menopausia de 1 a 1,5 años antes de las que viven a menos de 1.000 m.

c. Modificaciones en el tiempo

Ha existido la creencia de que la edad de la menopausia se iba retrasando con el paso de los siglos, de la misma manera que se ha adelantado la menarquia, pero esto no sólo no se ha demostrado, sino que la edad de la menopausia permanece estable, a pesar del importante incremento en el último siglo de la esperanza de vida.

d. Estado civil y profesión

Se ha observado que las mujeres que trabajan son menopáusicas antes y que el estado marital retrasa la edad de la menopausia⁸⁰.

e. Factores socioeconómicos

No se ha encontrado que los ingresos, la educación y la profesión del marido se encuentren asociados con la edad de la menopausia, aunque algunos informes indican que sí existe relación con la talla de la mujer y con el peso, por lo que parece influir la nutrición en el sentido de que las mujeres son menopáusicas antes en las regiones más deprimidas³⁸.

f. Obesidad

Se menciona en los textos antiguos como factor de precocidad, pero los estudios más recientes no han encontrado diferencias significativas³⁸.

g. Paridad

Parece que las nulíparas son menopáusicas antes y que la edad se eleva con la paridad, aunque no son hallazgos que se hayan publicado en otras series. Sin embargo, la relación se invierte después del cuarto hijo. Se cree que también influye la edad de la madre cuando tiene su primera gestación. De manera que si esto ocurre antes de los 28 años aumenta la precocidad de la menopausia³⁸.

h. Anticonceptivos orales

Se ha pensado que la supresión de la ovulación podría conducir a una edad de la menopausia más avanzada. Sin embargo, no se ha demostrado que los anticonceptivos orales jueguen algún papel en este sentido.

i. Tabaco

Es de todos los parámetros de los que estamos analizando el que tiene una influencia más clara. La menopausia sobreviene antes en las mujeres que fuman, siendo importantes la cantidad y la duración del hábito de fumar.

Este fenómeno podría deberse a la acción de la nicotina sobre los centros hipotalámicos, sobre el hígado por inducción enzimática, o a la acción

nociva directa del benzopireno que provocaría una desaparición de las células germinativas. Realmente es difícil hacerse una idea exacta de los factores que influyen en la edad de la menopausia, ya que los métodos de análisis han sido durante mucho tiempo poco científicos y no tienen en cuenta la relación entre los diferentes parámetros.

3.2. Endocrinología de la Menopausia

Las dos misiones fundamentales que tiene el ovario, la producción de óvulos y de hormonas, se van a alterar de manera importante en la menopausia, puesto que va a perder su potencial reproductivo y sus perfiles hormonales.

3.2.1. Cambios morfológicos

Sabemos que el número de folículos del ovario comienza a disminuir desde la vida intrauterina (semana 20 del desarrollo aproximadamente). Este descenso continúa hasta la menopausia que es cuando tiene lugar la depleción casi total de los folículos, aunque algunos pueden persistir en un ovario postmenopáusico pero no responden, o sólo lo hacen ocasionalmente.

Los otros cambios morfológicos del ovario se caracterizan por la atrofia o la hipertrofia de este órgano. Algunas mujeres presentan una gran atrofia, mientras que en otras se observa una hipertrofia y una hiperplasia de las células del estroma. Estas células se han identificado como la fuente de precursores de andrógenos, principalmente androstendiona y testosterona. Se calcula que del 30% al 50% de estos precursores androgénicos proceden del ovario en los primeros años de la postmenopausia.

3.2.2. Cambios hormonales

La instauración de la menopausia suele estar precedida de un tiempo variable de ciclos anovulatorios. Al no haber ovulación, deja de formarse el cuerpo amarillo, cesa la producción de progesterona y el endometrio no desarrolla su fase de secreción. Durante meses, e incluso años, puede persistir

un desarrollo folicular ánoovulatorio con oscilaciones variables de la secreción de estrógenos, hasta que finalmente acaba por desaparecer tal actividad.

La secreción hipofisaria de gonadotropinas es inhibida por los estrógenos. En las proximidades de la menopausia, al disminuir los estrógenos de origen ovárico, tiene lugar un incremento considerable de la FSH, a cuyo estímulo, sin embargo, el ovario va dejando paulatinamente de responder.

Se observan modificaciones en los niveles de FSH cuando una mujer está próxima a los 40 años. El nivel medio de FSH se eleva gradualmente aunque no llega a la altura que estará después de la menopausia.

En la postmenopausia el nivel es superior al del pico de la ovulación. Estos cambios de la FSH se relacionan con censo del número de folículos, de los estrógenos y de la inhibina, así como con otros factores que aún no se han identificado.

La menopausia, o sea el último período menstrual, es la consecuencia de una producción inadecuada de estradiol que no produce proliferación del endometrio seguida de hemorragia.

El estradiol es el estrógeno principal de la en edad fértil. El 95% lo producen los ovarios y el resto se obtiene de aromatización periférica. Su concentración media disminuye después de la menopausia.

En este período el ovario produce cantidades importantes de andrógenos: androstendiona y testosterona. La estrona es el estrógeno principal producido después de la menopausia. Proviene principalmente de la conversión periférica de la conversión periférica de la androstendiona ovárica y suprarrenal.

La conversión de andrógenos a estrógenos se modifica en relación al peso corporal y a la edad. Se trata de un mecanismo compensador de producción de estrógenos que ocurre en mujeres capaces de producir suficientes andrógenos en el ovario. Con el descenso de estrógenos y el aumento relativo de andrógenos no hay descenso importante en las globulinas portadoras, lo cual también es un mecanismo compensador.

Después de la menopausia los niveles de progesterona son bajos y se asemejan a los de la fase folicular. El dato patognomónico que anuncia el comienzo de la insuficiencia ovárica es un aumento sostenido de FSH. Este aumento de FSH suele preceder al aumento de LH.

Ambas hormonas alcanzan sus valores máximos dos o tres años después de la menopausia.

En resumen, los cambios hormonales del climaterio consisten en una ausencia de folículos, lo que ocasiona una disminución de estrógenos y un aumento de andrógenos ováricos.

Desaparece la retroacción negativa por lo que aumentan los niveles de gonadotropinas y probablemente de GnRH procedente del hipotálamo.

3.2.3. Cambios en los tejidos efectores

Los tejidos efectores se caracterizan por la presencia en sus células de moléculas receptoras altamente específicas que son capaces de unirse al esteroide circulante específico. Como resultado de la presencia de estos receptores específicos los tejidos efectores pueden entrar en acción por hormonas que circulan aún en concentraciones muy bajas.

Los receptores se han identificado en muchos tejidos, los cuales responderán a la presencia o ausencia de hormonas esteroideas alterando su estructura o su función. Estas respuestas de los tejidos efectores son de interés para valorar la historia natural de la menopausia y de los problemas que pueden surgir de ella. Por ejemplo, la vulva y la vagina pueden adelgazarse y atrofiarse conduciendo al dolor (dispareunia), hemorragia y otras molestias. Los efectos sobre la vejiga pueden producir un aumento en la frecuencia o urgencia de la micción. Así pues, el déficit de estradiol conduce a una variedad de signos y síntomas de función alterada.

Sin embargo, la relación causa/efecto entre los cambios hormonales y sus efectos en los tejidos efectores no es siempre clara ya que a los fenómenos del climaterio se les debe sumar la acción del envejecimiento. Por ello, tejidos efectores diferentes pueden afectarse en momentos diferentes en personas diferentes.

Es necesario continuar investigando para conocer todos los lugares donde los receptores hormonales esteroideos están presentes y aclarar la respuesta de estos tejidos al estado endocrino del climaterio. Sin embargo, hay evidencia más que suficiente para concluir que los cambios hormonales de la menopausia producen grandes efectos sobre los tejidos pélvicos y

extrapélvicos. Estos efectos ocurren también cuando por otras causas hay un déficit de estradiol.

3.3. Importancia social de la Menopausia

La Menopausia como oportunidad

El aumento de interés por el significado de los estrógenos en el funcionamiento normal del organismo y la prevención de enfermedades, junto al número creciente de mujeres que viven décadas después de la menopausia, han llevado a una mayor preocupación por la menopausia y los beneficios potenciales de la terapia estrogénica. El interés es tanto científico como público, ya que se ha calculado que probablemente el 95% de las mujeres lleguen a la menopausia en los países desarrollados. En España hay más de 6 millones de mujeres que tienen 50 años o más; en EEUU hay 40 millones de posmenopáusicas y las estadísticas de la OMS indican que tenemos alrededor de 750 millones de posmenopáusicas en el mundo. Estos datos nos reflejan la importancia cuantitativa y cualitativa de este sector de la población.

Ha habido un gran incremento en la esperanza de vida que se ha observado, principalmente a partir de comienzos de este siglo. Hace 1000 años la esperanza de vida era de 25 años; en 1900 era de 35 años, y desde entonces se ha doblado. También es importante señalar que la esperanza de vida es mayor para la mujer que para el hombre. En definitiva, la mujer permanecerá en situación de privación hormonal entre 25 y 35 años, en muchos casos más de un tercio de su vida.

Mientras las expectativas de vida son cada vez más altas en los países industrializados, en África la muerte llega a los 50 años. Pero también en el Tercer Mundo la vida se ha alargado y es lógico suponer que continúe en esa línea. En 1940 la media de vida en África era de 38 años y de 40 en Asia, en América Latina se llegaba a los cincuenta y en Oriente Medio a los 45; en Europa, en vísperas de la Segunda Guerra Mundial, la esperanza de vida era ya de 66 años.

Está claro que la prolongación de la esperanza de vida es un dato de gran valor en el problema que nos ocupa, pero también debemos tener presente que, aunque la mejoría en cantidad de vida de una mujer se miden en

años, es igualmente importante considerar la calidad de vida durante la postmenopausia.

Por todo ello, el climaterio es una de las situaciones más interesantes que se le presentan al ginecólogo en el ejercicio de la profesión. Los acontecimientos que ocurren en este período son tan diversos que deben tener conocimientos y experiencia suficientes para resolverlos. Es una situación en la que no están claramente definidos los límites entre lo fisiológico y lo patológico, por lo que hay que continuar trabajando con el fin de conseguir la mayor luz posible sobre esta cuestión.

Es posible que factores culturales y socioeconómicos influyan sobre la frecuencia y gravedad de los síntomas menopáusicos. De hecho, hay estudios que observan diferencias sobre la respuesta ante la menopausia de distintos grupos de población, según sus características étnicas, culturales, socioeconómicas, etc. Existen diferencias étnicas en cuanto a la aceptación de la sintomatología psíquica y psicosomática. En los países de menor nivel económico y las clases socioeconómicas más bajas, consultan menos por las molestias de la menopausia.

Pero una cosa es la actitud que la mujer puede adoptar frente al climaterio y otra es las modificaciones y cambios objetivos atribuibles a la pérdida de la función gonadal.

Ya hemos señalado que la mayoría de las mujeres de nuestro país vivirán una tercera parte de su vida después de la menopausia, pero así como se prolonga la esperanza de vida, también aumenta el período de tiempo de déficit hormonal cuyas consecuencias pueden ser graves. La pérdida de la función ovárica tiene una serie de repercusiones debidas a la acción sistémica de los estrógenos. Algunas de ellas se integran dentro del complejo sintomático de la mujer climatérica (trastornos vasomotores, atrofia génito-urinaria y efectos psicofisiológicos), mientras que otras se encuadran dentro de patologías crónicas que se agravan como consecuencia de la aparición de la menopausia, principalmente enfermedades cardiovasculares y osteoporosis.

Los médicos que atienden a mujeres en el momento de la menopausia tienen por lo tanto una excelente oportunidad y, por lo consiguiente, una obligación importante. La intervención médica en este momento de la vida

ofrece a las mujeres varios años de efecto beneficiosos de la asistencia sanitaria preventiva y esto representa una oportunidad que debe aprovecharse.

La cronología de la aparición de los problemas relacionados con el hipoestrogenismo consiste, en un primer momento, durante la perimenopausia, en la aparición de trastornos menstruales y síndrome climatérico, a medio plazo pueden aparecer síntomas relacionados con la atrofia cutánea y génito-urinaria apareciendo a largo plazo los problemas cardiovasculares, óseos y las alteraciones psíquicas.

El tratamiento hormonal sustitutivo (THS) no sólo ha demostrado su eficacia en el alivio de los síntomas somáticos y psíquicos inmediatos al cese de la producción hormonal, sino que su poder preventivo y terapéutico se extiende a los procesos más tardíos, como la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares.

3.4. La necesidad de la Menopausia. Teorías antropológicas.

Algunas hipótesis intentan explicar el porqué de la necesidad de la menopausia en la especie humana.

3.4.1. Hipótesis *stopping early*.

En las especies en las que el cuidado materno era crucial para la supervivencia de la prole, las madres que paraban de reproducirse antes, podían terminar con más vástagos vivos. Si los bebés eran incapaces de sobrevivir a la muerte de sus madres, y el embarazo y el parto eran más debilitantes al aumentar la edad, entonces mejor sería que las madres mayores no tuvieran hijos. Esta teoría manifestada por primera vez por Williams⁸¹ en 1957 es muy interesante aunque ha sido criticada. Un ejemplo que ilustra esta teoría es el conocido caso del chimpancé Flo narrado por Tane Goodalps⁸²: cuando Flo tuvo su último hijo estaba muy débil y poco después del parto murió, y su hijo también murió. Es más, su hijo anterior, privado de su madre, también falleció.

La crítica a esta teoría surge de los que afirman que, en algunas poblaciones primitivas de cazadores y recolectores, la muerte de la madre no

tiene un efecto importante sobre los vástagos que han cumplido los 5 años de vida. En Hadza, Tanzania septentrional, los hombres son grandes cazadores y especialistas en capturar grandes cuadrúpedos⁸³. Si tienen éxito en la caza, ésta se reparte entre los habitantes del poblado, quedando sólo una pequeña parte para la propia familia. Los niños de esta etnia, a partir de los 5 años, pueden obtener la mitad de sus necesidades nutricionales con los productos estacionales que recogen.

3.4.2. Hipótesis de "las abuelas".

En los humanos destetar un bebé significa que hay que suplir su alimentación. Un chimpancé después del destete puede procurarse su comida, pero los humanos son una carga mayor para sus madres. Cuando el niño recién destetado no es capaz de alimentarse por sí mismo, la madre que continúa ocupándose de él, tiene menos tiempo de prepararse para tener un nuevo bebé. Aquí es dónde está el papel de la abuelas⁸⁴, que no tiene semejanza en otros primates (no hay abuelas). Las hembras de la especie humana que han perdido su capacidad reproductiva pueden buscar provisiones y cuidar a sus nietos, lo que además tiene un efecto positivo sobre su propio bienestar físico y sobre sus hijas, que así pueden dedicarse a tener otro bebé más rápidamente.

Estas teorías pueden explicar como fueron necesarias en la supervivencia y evolución de la especie humana, en nuestro ancestral pasado, la caza, los cuidados maternos y los beneficios que aporta la menopausia.

De todos modos no conocemos exactamente porqué se programó la menopausia femenina, pero podemos aceptar que la esperanza de vida en los humanos, mayor que la de los simios (cuarenta años de media para los chimpancés), se debe a dos procesos de adaptación biológica, la menopausia y el aumento de inversión en los mecanismos de reparación somática.

4. MENOPAUSIA PRECOZ O FALLO OVÁRICO PREMATURO.

La menopausia, sus manifestaciones clínicas y sus complicaciones son motivo de interés debido a que induce en quien la padece un envejecimiento prematuro con complicaciones cardíacas, óseas, psíquicas y metabólicas que constituyen causas importantes de morbimortalidad en éste segmento de edad. Se trata de un problema de una frecuencia creciente ya que, como hemos señalado, se está produciendo un envejecimiento de la población mundial: se estima que la población anciana mundial aumentará más del doble entre 1998 y 2025⁸⁵.

Se calcula que globalmente existen 50 millones de mujeres en el mundo en menopausia.

Fisiológicamente este fenómeno se sucede de manera progresiva desde aproximadamente los 38-40 años de edad, momento en el cual la fertilidad empieza a declinar: se calcula que este proceso se inicia cuando quedan aproximadamente 25000 folículos ováricos. En una primera fase se produce un aumento sutil de los niveles de FSH, probablemente debidos a una menor producción de inhibina por las células de la granulosa en los folículos senescentes. Éste aumento de FSH determina un desarrollo folicular más rápido con un acortamiento de los ciclos y un agotamiento progresivo de los folículos restantes. A medida que se van agotando los folículos aumenta la aparición de ciclos anovulatorios que determinan una segunda fase en la que se produce un aumento progresivo de la duración de los ciclos hasta su cese definitivo. La menopausia aparece cuando el número de folículos residuales desciende por debajo del umbral crítico en torno a 1000, con independencia de la edad.

El diagnóstico de menopausia es generalmente clínico realizándose cuando existe un periodo de amenorrea superior a los doce meses acompañados de cifras hormonales de FSH > 40 mU/ml y Estradiol < 20 pg/ml.

4.1. Edad de aparición de menopausia.

La edad de aparición de la menopausia se puede considerar un parámetro complejo que depende de la interacción de múltiples factores ambientales, genéticos y hábitos de vida. La edad media de aparición según diversos estudios se sitúa entre 50 y 52 años, apareciendo en el 95 % de los casos entre los 45 y los 55 años. Entre los factores identificados que con más fuerza intervienen en la edad de aparición de la menopausia destaca el tabaco (con una variación de hasta 1,5 años, existiendo una relación dosis dependiente con el número de cigarrillos fumados y la duración del hábito⁸⁶), la raza y la herencia familiar. Más dudosa es la influencia de otros actores como la paridad y el uso de anticonceptivos orales. Hay pruebas suficientes para creer que las mujeres desnutridas y vegetarianas presentan una menopausia más precoz^{87 88}. Esto es debido a la contribución de la grasa corporal a la producción de estrógenos mediante la aromatización periférica de los andrógenos. Por otro lado, se sabe que las mujeres que tienen un consumo moderado de alcohol presentan unas concentraciones de estrógenos en sangre y orina más elevadas, así como una mayor densidad mineral ósea⁸⁹ por lo que se cree que el consumo frecuente de alcohol se asocia con una menopausia más tardía⁹⁰. No existe evidencia a favor de la relación entre edad de menarquia y edad de menopausia. Con la mejora de las condiciones sociosanitarias de la población se ha producido un adelantamiento en la edad de la menarquia sin que se halla evidenciado cambio alguno en la edad de la aparición de menopausia, lo cual puede sugerir la influencia limitada de éste tipo de factores.

4.2. Menopausia precoz o fallo ovárico prematuro.

Se define menopausia precoz como el cese de la función ovárica por debajo de los 40 años, si éste se produce entre los 40 y 45 se denomina menopausia temprana. La primera referencia histórica al respecto la encontramos en 1967 (De Moraes-Ruehsen)⁹¹ cuando se definió el fallo ovárico prematuro (FOP) como el cese no fisiológico de la menstruación antes de los

40 años y después de la menarquia. Es una entidad clínica caracterizada por la existencia de amenorrea de al menos 4 meses de evolución, síntomas de déficit estrogénico, elevación de gonadotropinas mayores de 40 mU/ml con disminución de estrógenos menores de 5 pg/ml (obtenidas en dos ocasiones distintas), que se presenta en mujeres antes de la edad normal de la menopausia.

Este síndrome ha recibido distintas denominaciones que han creado una cierta confusión terminológica. Las más utilizadas han sido: Menopausia precoz, extinción ovárica precoz, hipogonadismo o amenorrea hipergonadotropa, ovarios resistentes y FOP. Éste último término es el que más aceptación tiene y el más utilizado en la actualidad.

Antes se pensaba que los niveles de FSH elevados en una mujer perimenopáusica, era una clara evidencia del agotamiento folicular, equivalente a un cese irreversible de la función ovárica. Hoy se considera que el fallo ovárico precoz no es una situación de cese permanente de la misma. Aproximadamente un 50% de mujeres jóvenes en tales condiciones pueden presentar una función ovárica intermitente de 4 a 8 años más.

Se ha descrito un caso de FOP, que tras 8 años de amenorrea presentó un ciclo ovulatorio espontáneo⁹². Incluso de un 5-10% de los casos pueden llegar a tener un embarazo espontáneo⁹³.

La incidencia de este síndrome descrita en la literatura es muy divergente. Recientemente, el Study of Women Across the Nation (SWAN) ha señalado una incidencia de 1,1 % antes de los 40 años. Este porcentaje representaría aproximadamente unos 70.000 casos en España.

La menopausia precoz es más frecuente en hispanas y mujeres de raza negra (1,5%) disminuyendo su prevalencia en caucásicas y asiáticas (0,5 %) ⁹⁴.

La aparición de menopausia precoz se asocia con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, osteoporosis, cáncer epitelial de ovario y Alzheimer. De manera opuesta, la menopausia tardía se asocia a una mayor incidencia de cáncer de mama⁹⁵, con un aumento de 1,03% de RR por cada año de retraso⁹⁶.

El efecto cardioprotector de los estrógenos parece deberse a que modifican positivamente varios de los parámetros relacionados con la salud cardiovascular. Por un lado inducen un perfil lipídico favorable (aumento de

partículas de HDL colesterol y disminución de partículas de LDL colesterol implicadas en la formación de placas de ateroma), por otro, tienen un efecto directo sobre las células mioepiteliales y el microambiente endotelial con efecto vasodilatador y antitrombótico mediado por la liberación de Óxido nítrico y prostaciclina⁹⁷.

Los estrógenos pueden proteger la función del sistema nervioso central por varios mecanismos; protegen contra la citotoxicidad neuronal provocada por la oxidación, reducen la concentración sérica del componente amiloide P (la glucoproteína identificada en los ovillos neurofibrilares del Alzheimer) y aumentan las sinapsis y el crecimiento neuronal, en especial la densidad de espinas dendríticas^{98 99}.

Fisiopatología del fallo ovárico prematuro

En condiciones normales, al comienzo de la vida embrionaria se produce en el feto hembra la migración de las células germinales hacia la cresta genital. De la interacción de ambas se desarrolla la gónada femenina, que en la semana 20 tiene 6-7 millones de ovogonias. Hacia la semana 25 comienza un proceso continuo de atresia que hace que en el momento del nacimiento sólo queden entre 300.000 y 400.000. Al final de la vida reproductiva desaparecen por completo como consecuencia de que en cada ciclo alrededor de 1.000 folículos inician el desarrollo mientras sólo uno ovula y el resto se atresian.

Existen principalmente dos tipos fisiopatológicos de fallo ovárico prematuro^{100 101}: por depleción folicular y por disfunción folicular.

4.2.1. Fallo ovárico prematuro por depleción folicular ovárica.

Son los casos de FOP en los que la reserva o *pool* folicular está disminuido provocando un agotamiento prematuro de los mismos. El número de folículos disponibles puede estar disminuido por dos mecanismos fundamentales:

- Debido a que no hay emigración de los gonocitos hacia la cresta genital o emigran en menor número de lo normal originándose por lo tanto una gónada patológica con escasa o nula dotación folicular.
- Debido a que la emigración de los gonocitos sea normal, pero que se acelere el proceso de atresia tanto en la vida prenatal como en la postnatal, originándose gónadas sin dotación folicular o con escasa dotación de la misma, que fracasarán en su función prematuramente.

La tasa de atresia folicular tiene variaciones individuales en las que estarían involucrados principalmente factores genéticos. No se conoce bien los mecanismos que gobiernan la atresia, pero puede estar acelerada por alteraciones o ausencia del cromosoma X y por alteración de las gonadotropinas. También se ha sugerido que alteraciones del timo podrían estar implicadas en la tasa de atresia folicular.

Desde el punto de vista etiológico se distinguen varios tipos de FOP por depleción folicular ovárica:

- **Pool folicular inicial deficiente:**

- Disgenesia gonadal pura (46 XX): Déficit de células germinales en los ovarios. Se han descrito casos con fenotipo femenino, actividad sexual y amenorrea secundaria tras dos años de reglas normales.
- Aplasia o hipoplasia tímica.
- Idiopática.

- **Atresia folicular acelerada:**

El desarrollo de un FOP por depleción folicular ovárica debido a una atresia folicular acelerada puede responder a distintos trastornos que veremos en el capítulo siguiente.

ATRESIA FOLICULAR ACELERADA

a) Alteraciones cromosómicas:

- Numéricas: Aparecen en un 20%-50% de los FOP. Son varios los estudios recientes que postulan que es necesaria la presencia de dos cromosomas X para el desarrollo normal de la gónada. La ausencia de

un cromosoma X no interfiere en el proceso de emigración de las células germinales, pero sí acelera la atresia folicular.

- *Síndrome de Turner*. Cursa típicamente con amenorrea primaria, fenotipo característico y gónadas acintadas, aunque no debe olvidarse que hasta un 3% de estas pacientes pueden tener alguna menstruación e incluso quedar gestantes.
- *Mosaicismos X*. (XO/XXX o XX/XO). Son las alteraciones cromosómicas más frecuentes. La mayoría tienen un fenotipo normal. El 3% presentan fenotipo Turner y el 12% pueden menstruar. En el caso del *Síndrome de la Triple X*, alteración poco frecuente, presenta un fenotipo casi normal (obesas o de talla elevada), con una disminución del coeficiente intelectual. El daño gonadal, en los casos en que esté presente, suele ocurrir una vez que ha tenido lugar el desarrollo y la diferenciación del ovario y por ello, con frecuencia, queda algún grado de función folicular.

- Estructurales:

- Delecciones del cromosoma X:
 - Las *alteraciones del brazo corto* (XXp o 45XO/46XXp) pueden cursar con talla baja y fenotipo de Turner, pero el 25% presentan alguna regla y un desarrollo somático normal. La mayoría de las alteraciones del brazo corto no afectan la función ovárica: la función gonadal se mantiene si más de la mitad del brazo corto (Xp21) está presente.
 - *Alteraciones del brazo largo* (XXq): Es importante para la función ovárica normal una particular región del brazo largo del cromosoma X, la porción comprendida entre Xq13 y Xq26. Se ha descrito la existencia de dos genes FOP1 y FOP2, localizados en dicha región y responsables de FOP¹⁰².
 - *Síndrome de X frágil*. El llamado sitio frágil es un marcador citogenético localizado en la parte distal del brazo largo del cromosoma X (Xq27). Las mujeres portadoras de X frágil presentan tres veces más frecuencia de FOP que los controles¹⁰³, lo que puede deberse a que presentan

ovulaciones múltiples que llevan a un agotamiento prematuro de los folículos y/o a que las portadoras posean un menor número de ovocitos al nacimiento, que produce su depleción a una edad relativamente temprana. La prevalencia del fallo ovárico prematuro en las portadoras del síndrome del cromosoma X frágil es del 10-20%. Se han identificado al menos 8 genes que cursan con FOP, 5 en el cromosoma X (gen FMR1) y 3 en autosomas.

- Además, al margen de las alteraciones de los cromosomas sexuales hay cada más certeza de la influencia de un factor genético y hereditario en el FOP, habiéndose descrito casos familiares.
- Entre otras causas genéticas relacionadas con historia familiar de FOP, distinguimos mutaciones situadas en: *FSH receptor*, *GAL T* (galactosemia), *FOXL2*, *INHA* (gen de la inhibina A), *EIF2B* (familia de genes relacionada con fallo ovárico precoz y leucodistrofia a nivel del sistema nervioso central), *BMP15* y *AIRE* (responsable de síndrome poliglandular).
- Galactosemia: raro trastorno hereditario autosómico recesivo del metabolismo de los hidratos del carbono, motivado por déficit de la enzima galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa¹⁰⁴, que ocasiona un trastorno caracterizado por retraso mental, cataratas, hepatoesplenomegalia y disfunción tubular renal. Produce alteraciones ováricas en un 30-60 % de los casos. El menor número de ovogonias puede ser el resultado de un efecto tóxico directo de metabolitos de la galactosa sobre la migración de las células germinativas a la cresta genital^{105,106}. El fallo ovárico prematuro es habitual e irreversible.

b) Agentes externos iatrogénicos:

- Quimioterapia: su efecto sobre el ovario produciría, por una parte, la destrucción de las células en desarrollo de la granulosa y la teca, componentes necesarios para el desarrollo folicular y, por otra, la alteración del DNA celular, que afectaría a los folículos primordiales en reposo. Los factores determinantes para la producción de FOP

post-tratamiento son la edad de la paciente, la dosis y el tiempo de administración. Al comparar con datos de volúmenes ováricos de otros autores, en las pacientes sometidas a tratamientos oncológicos la edad de los ovarios sería de, aproximadamente, 10 años superior a la cronológica¹⁰⁷.

- Radioterapia: el FOP producido por radioterapia depende de la edad de la paciente y la dosis administrada. Dosis mayores de 600 cGy producen un FOP definitivo, mientras que dosis de 400-500 cGy sólo producen alteraciones irreversibles en el 50% de los casos¹⁰⁸.
- Cirugía: está en discusión la afectación que puede producir en la función ovárica la cirugía que alterara la vascularización ovárica, como la histerectomía o cirugía a nivel tubárico.
- Tabaco: es uno de los factores de riesgo mas relacionado con la menopausia precoz¹⁰⁹. Las fumadoras están más predispuestas a tener menopausia natural un año antes que las no fumadoras¹¹⁰ y a presentar una perimenopausia mas corta¹¹¹. Fumar se asocia también con peores resultados reproductivos y trastornos menstruales, como ciclos más irregulares y cortos debidos al acortamiento de la fase folicular¹¹² y a las cifras incrementadas de FSH.¹¹³
- Alcohol: en varios estudios se observa una posible asociación entre alcohol y niveles de estrógenos, lo que sugiere que la menopausia puede producirse mas tarde en mujeres que beben alcohol¹¹⁴.
- Cafeína: Lucero et al observaron que las mujeres que consumían mas de una taza de café al día tenían unos niveles de estrógenos significativamente mayores que los de las mujeres que no lo tomaban¹¹⁵.
- Alteraciones inmunológicas.
- Idiopáticas.

4.2.2.2. Fallo ovárico prematuro por disfunción folicular.

La presencia de folículos no es sinónimo de una función ovárica normal. En estos casos pueden detectarse algunas estructuras foliculares pero existe una falta de respuesta a los estímulos habituales de los mismos, es decir, existe una disfunción ovárica con folículos cuantitativamente normales o algo disminuidos. En estos casos puede tardíamente aparecer una cierta actividad ovárica.

Las dos formas más frecuentes son la ooforitis (respuesta inmunológica contra el ovario en donde encontramos menos folículos pero no ausencia de los mismos) y el Síndrome del ovario resistente (ovarios con número de folículos normales que no responden a los estímulos por fallo en la recepción del mismo).

Desde el punto de vista etiológico se distinguen varios tipos de FOP por disfunción folicular:

c) **Alteración inmunológica** (autoinmunidad y ooforitis linfocitaria):

Varios estudios sugieren que la autoinmunidad es una de las causas potenciales del FOP¹¹⁶. Se ha relacionado el FOP con enfermedades autoinmunes órganoespecíficas, como la enfermedad de Addison. Ésta es una endocrinopatía poco frecuente, con mayor prevalencia en el sexo femenino (3:1), y que se asocia con un fallo endocrino múltiple¹¹⁷. Se distinguen dos formas:

Tipo I (hipoparatiroidismo, Addison, candidiasis mucocutánea):

Se inicia en la juventud y más de un 60% de las mujeres presentan FOP.

Tipo II (hipotiroidismo y Addison): De inicio más tardío, donde menos del 10% desarrollan FOP.

Normalmente, el fallo ovárico prematuro precede a la insuficiencia suprarrenal, por lo que ante el diagnóstico de FOP procede mantener la vigilancia suprarrenal (alrededor de un 4% de mujeres con FOP, presentarán una insuficiencia adrenal asintomática).

Sin embargo, la enfermedad autoinmune que con más frecuencia se relaciona con el FOP es el hipotiroidismo (aproximadamente un 20% de mujeres con FOP desarrollarán un hipotiroidismo autoinmune). Otras enfermedades que se

asocian son miastenia gravis, vitíligo, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

A pesar de todo, se desconoce el mecanismo implicado en la autoinmunidad contra el ovario. Para el diagnóstico de FOP de causa inmune se requiere la presencia de infiltrados linfoplasmocitarios en los folículos y de anticuerpos específicos.

d) Déficit enzimáticos:

- De 17 a hidroxilasa
- De 17-20 desmolasa
- De colesterol desmolasa
- De galactosa 1-fosfato-uridiltransferasa

e) Síndrome del ovario resistente y Anomalías gonadotrópicas:

Define al ovario resistente la presencia de amenorrea, cariotipo normal, caracteres sexuales normales, hipergonadotropismo, hipoestrogenismo, resistencia o baja sensibilidad a las gonadotropinas y presencia de abundantes folículos primordiales en los ovarios, sin infiltrado linfoplasmocitario. Siempre habiendo descartado otras causas de FOP.

La fisiopatología de este síndrome parece estar en relación con la resistencia de los folículos a la acción de las gonadotropinas. Resistencia que podría explicarse por la presencia de gonadotropinas biológicamente inactivas e inmunológicamente normales, por la alteración a nivel de sus receptores o por la presencia de factores antigonadotropinas.

4.2.2.3. FOP idiopático

En ocasiones no se observa ninguna causa que justifique el cuadro y hablamos entonces de un FOP idiopático. Su número va disminuyendo a medida que se cumplen y perfeccionan los protocolos de diagnóstico.

Algunos casos de FOP idiopático son transitorios, ceden espontáneamente y la paciente vuelve a recuperar sus ciclos y a normalizar gonadotropinas y

estrógenos, incluso puede quedar gestante y repetir el fallo ovárico. Es lo que se ha llamado fallo ovárico intermitente.

4.3. Clínica del FOP

El síntoma principal en el FOP es la amenorrea antes de los cuarenta años (secundaria en el 85% de los casos) u oligomenorrea. También son frecuentes la esterilidad primaria o secundaria y los síntomas propios del estado hipoestrogénico, como son los síntomas vasomotores, vaginitis, dispareunia y, en ocasiones, síntomas urinarios como disuria e incontinencia urinaria.

Concomitantemente pueden existir síntomas de otras endocrinopatías (diabetes, hipotiroidismo, alteración suprarrenal o paratiroidea), así como de otras enfermedades de origen inmunológico.

En cuanto a la evolución clínica del FOP cabe destacar que la instauración del cuadro clínico en ocasiones no es brusca, sino progresiva pasándose por un periodo semejante al de la perimenopausia, un estadio inicial con elevaciones de la FSH y con ciclos que pueden ser normales (a lo que se le denomina fallo ovárico oculto) y que existe la posibilidad de reversibilidad. La función ovárica puede reaparecer de forma intermitente y de manera impredecible de tal forma que hasta el 10-20% de las pacientes recuperan su función normal varios meses más tarde.

5.1. FACTORES GENÉTICOS QUE INFLUYEN EN LA PRESENTACIÓN DE LA MENARQUIA Y LA MENOPAUSIA.

Las edades de la menarquia y la menopausia son parámetros complejos que dependen de la interacción de una miríada de factores incluyendo elementos genéticos y socio-económicos. La importancia de factores genéticos es también evidente en estudios de madre-hijas y un estudio de casos control de 334 mujeres con menopausia precoz establece una probabilidad relativa (odds ratio) de 12,4 (95% IC 4,4 a 34,2) de padecer una menopausia precoz cuando varios parientes (madre, hermana, tía o abuela) la han padecido¹¹⁸. También apoya un componente genético responsable del agotamiento folicular un estudio sobre 275 gemelas monocigóticas y 353 gemelas dicigóticas en las que se tuvo en cuenta la posible influencia de otros factores ambientales como el tabaco, el nivel socioeconómico, la obesidad o el uso de anovulatorios orales, que pudieran alterar los resultados; dicho estudio encuentra una influencia de la herencia en la edad de la menopausia, que se cifra en un 63%¹¹⁹, además existen en la literatura gran número de trabajos que correlacionan alteraciones en genes, fundamentalmente en el cromosoma X, con el fallo ovárico precoz¹²⁰. Estudios de gemelos han estimado que alrededor de un 50-75% de las variaciones en la edad de la menarquia pueden atribuirse a factores genéticos.

5.1.1. Formas de investigación en genética y ruta estrogénica

La importancia y actualidad de la investigación genética, tanto en su relación con la edad de la menarquia o la edad de la menopausia, como con otros procesos relacionados con los estrógenos queda reflejada en las publicaciones aparecidas desde que se descifró el código genético humano, no solo entre genes de la ruta estrogénica, sino también entre otros genes candidatos

Las estrategias de conocimiento sobre genética y edad de menarquia y menopausia utilizadas hasta el momento, se han basado en estudios de asociación, análisis del ligamiento y los estudios de funcionalidad¹²¹.

Los estudios de asociación genética examinan el genoma de individuos buscando polimorfismos de un *gen candidato* con el propósito de identificar asociaciones estadísticamente significativas entre el rasgo estudiado y la variante del genoma de los individuos en el estudio. En la actualidad, la mayoría de los estudios de asociación son univariantes, y con ellos se persigue el aislamiento de genes que den lugar a enfermedades, síndromes, rasgos clínicos o efectos adversos a la medicación usada.

Cómo lograr un *gen candidato* se consigue tras un meticuloso proceso donde se mezclan experimentos biológicos o moleculares, junto con modelos animales donde una mutación vaya asociada a un fenotipo determinado. Entre estos últimos se incluyen las mutaciones naturales que en humanos causan enfermedades con herencia mendeliana, los experimentos de sobre-expresión (experiencias transgénicas) y los de bloqueo de la expresión génica (*knock-out*).

Una vez identificado el gen candidato, se localizan las variantes alélicas comunes (polimorfismos genéticos) asociadas con alguna modificación en la función de las proteínas codificadas por dicho gen. Si el polimorfismo no determina variación en la función de gen se llama polimorfismo *anónimo* mientras que aquellos casos donde se altera su función se denominan *polimorfismos funcionales*; y pueden afectar a la región codificante, provocando un cambio en la secuencia de aminoácidos; a la región promotora 5' asociándose a diferencias en la transcripción del ARN; o a la región 3' determinando diferencias en la degradación del ARN mensajero.

El análisis del ligamiento se realiza en familias o parejas de hermanos en los que mediante marcadores o microsatélites se identifican regiones en cada uno de los cromosomas donde puede estar localizado el gen responsable de la enfermedad o fenotipo que presentan. A medida que se van descubriendo genes implicados, se empiezan a considerar determinados procesos ginecológicos como enfermedades poligénicas moduladas por factores ambientales, y donde la predisposición, la patogenia o la respuesta a los tratamientos dependen de la interacción entre diferentes genes o de ellos con factores ambientales.

5.1.2. Polimorfismos genéticos en la ruta estrogénica y su relación con la edad de la menarquia y menopausia

Existen dos tipos de receptores para los estrógenos, el alfa o tipo 1 (ESR1) y el beta o tipo 2 (ESR2). Ambos pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, y están distribuidos de forma distinta en casi todos los tejidos del organismo, coincidiendo en algunos de ellos. ESR1 y ESR2 se comportan como reguladores de la transcripción del ADN. Así, la asociación del ligando a su receptor promueve su unión a una secuencia específica del ADN denominada elemento de respuesta a estrógeno (ERE), que se localiza en las regiones promotoras de los genes diana. Dicha regulación también puede estar mediada por una interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear kappa B (NFkB) o el factor específico de promotor tipo 1 (Sp1)¹²². A los ERE se unen una serie de proteínas coreguladoras llamadas proteínas de interacción con receptores nucleares (NRIP1), capaces de activar o reprimir la transcripción. Los trabajos que en la actualidad relacionan de una manera independiente las variantes genéticas de ESR1 y ESR2, junto a las observaciones de los estudios de interacción, confirma el relevante papel que juegan ambos receptores en las enfermedades relacionadas con los estrógenos¹²³. Lo cual es lógico si pensamos que los niveles estrogénicos siguen un proceso de regulación muy fino, de manera que una pequeña alteración en cualquiera de sus receptores podría modificar el proceso de señalización y dar lugar a un fallo en su función metabólica. Sobre estos genes y otros relacionados con su metabolismo se empiezan a aislar polimorfismos relacionados con enfermedades propias de la mujer, como la osteoporosis postmenopáusica, el síndrome del ovario poliquístico o el cáncer de mama.

Polimorfismos del gen del receptor de estrógenos alfa o tipo I (ESR1)

El gen del ESR1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6q25, está formado por 8 exones y 7 intrones, y en su estructura se han descrito varios lugares sobre los que asientan distintos polimorfismos, los más importantes en las regiones promotoras, las que determinan el inicio de su

transcripción. La mayoría de los estudios se han dirigido a tres polimorfismos: el PvuII (T397C), el XbaI (C351G) del intrón 1, y el VNTR (TA)_n¹²⁴ (Figura 2).

Polimorfismos del gen del receptor de estrógenos beta o tipo II (ESR2)

El gen que codifica el ESR2 en humanos se localiza en el cromosoma 14, en la región 14q23.2. Tiene 9 exones y su secuencia genómica comprende alrededor de 61,2 Kb. (Figura 2). El primer polimorfismo en *ESR2* no fue caracterizado hasta 1998 en población japonesa y consistía en una repetición dinucleótida (CA)_n altamente polimórfica en el intrón 5¹²⁵. Es por ello que en la actualidad, no existen muchos trabajos que relacionan el gen *ESR2* con enfermedades ginecológicas.

En el año 2001, se describieron dos polimorfismos (RsaI y AluI) incluidos en dicho gen en mujeres chinas con disfunción ovárica¹²⁶. Asimismo, se han estudiado polimorfismos de *ESR2* en pacientes diagnosticadas con endometriosis con resultados contradictorios^{127 128}.

Polimorfismos del gen del Receptor de FSH (FSHR)

El receptor para la hormona FSH (FSHR), pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y se encuentra dividido en tres regiones: el dominio extracelular, la región transmembrana y el dominio intracelular. El gen está localizado en el cromosoma 2, en la región 2p16.3 y tiene un tamaño de 192 Kb de ADN genómico. Está formado por 10 exones y 9 intrones (figura 3), donde el dominio extracelular abarca desde el exón 1 al 9, mientras que la región carboxiterminal del dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular están codificados por el exón 10.

La primera mutación encontrada en el gen FSHR en humanos fue descrita en 1995 en población finlandesa y consistía en un cambio de aminoácido (A189V), asociado a amenorrea primaria. Posteriormente se encontraron otras mutaciones (I160T, R573C, D224V, L601V, I191L, A189V y A419T) en casos esporádicos de amenorrea¹²⁹.

Los polimorfismos del gen FSHR que determinan una hipofunción de este receptor se acompañan de una menor pérdida de masa ósea en ratonas castradas, lo que sugiere que el exceso de expresión de este gen pueda estar detrás del remodelado óseo aumentado tras la menopausia¹³⁰.

Polimorfismos del gen de la aromatasa (CYP19A1)

El gen CYP19A1 se encuentra localizado en el cromosoma 15, en la región 15q21 (Figura 4) y codifica una enzima de la familia de la citocromo p450, encargada de catalizar la transformación (*aromatización*) de los andrógenos en estrógenos. Aparte de expresarse en órganos sexuales como el ovario, el testículo o la placenta, también se produce en otros lugares, fundamentalmente el tejido adiposo, fuente principal de los estrógenos tras la menopausia.

Polimorfismos de otros genes candidatos en la ruta estrogénica

Puesto que serán motivo del presente estudio, mencionaremos dos nuevos genes candidatos en las enfermedades relacionadas con los estrógenos, uno es el gen del NRIP (Figura 5) que, como se ha apuntado más arriba es una proteína que regula la transcripción interaccionando con los receptores nucleares de los estrógenos.

Otro gen candidato es el del BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), localizado en el cromosoma X, en la región Xp11.2.(Figura 6) Se sintetiza en el ovocito en forma de pre-pro-hormona y se procesa por una endopeptidasa a prohormona para más tarde adquirir su configuración tridimensional con la que se une al receptor. Pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes Beta (TGF-B), junto con el GDF9 (growth differentiation factor 9). Tanto BMP15 como GDF9 se unen a dos tipos de receptores transmembrana localizados en las células de la granulosa: el receptor de BMP tipo II (BMPRII), y el receptor de BMP tipo IB (BMPRI). Interviene en la producción estrogénica mediante varios mecanismos: estimulando la proliferación de las células de la granulosa, inhibiendo la expresión del FSHR y estimulando al factor de desarrollo folicular KL (KIT Ligand). El gen BMP15 se ha investigado en el FOP debido a su importante papel en la función ovárica.

Figura 2.

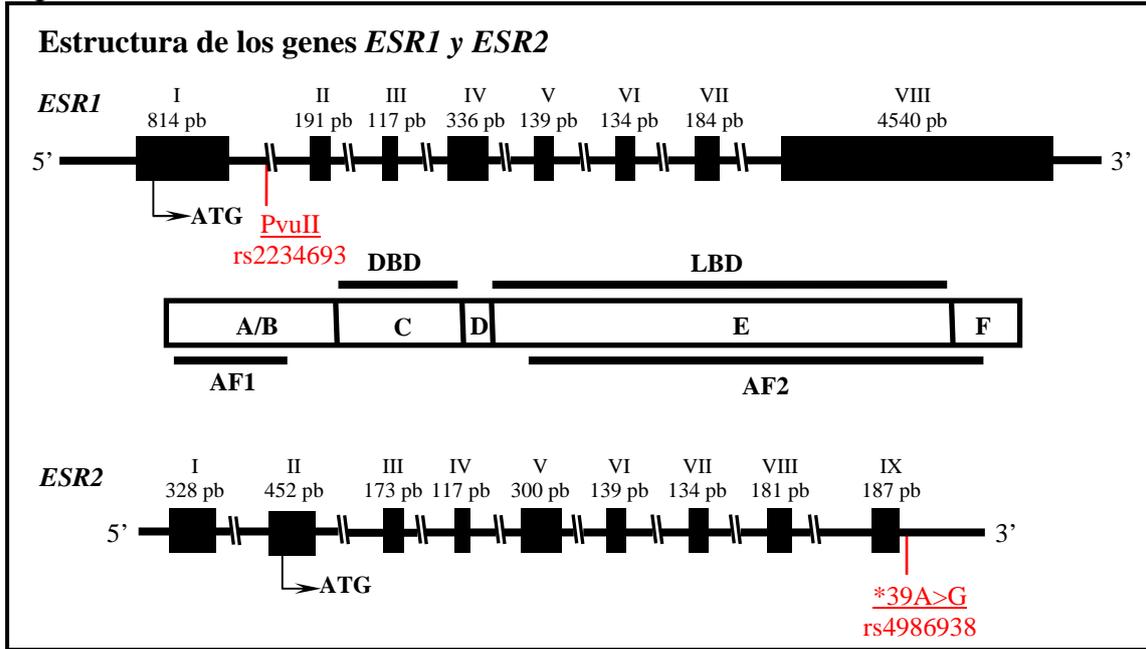


Figura 3.

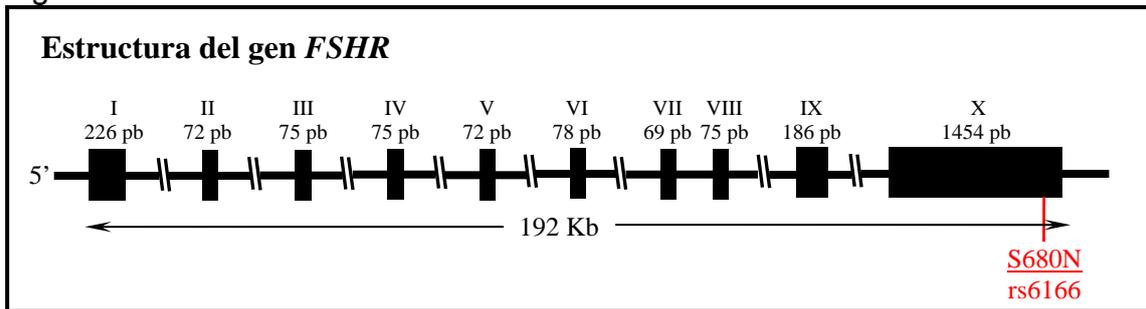


Figura 4.

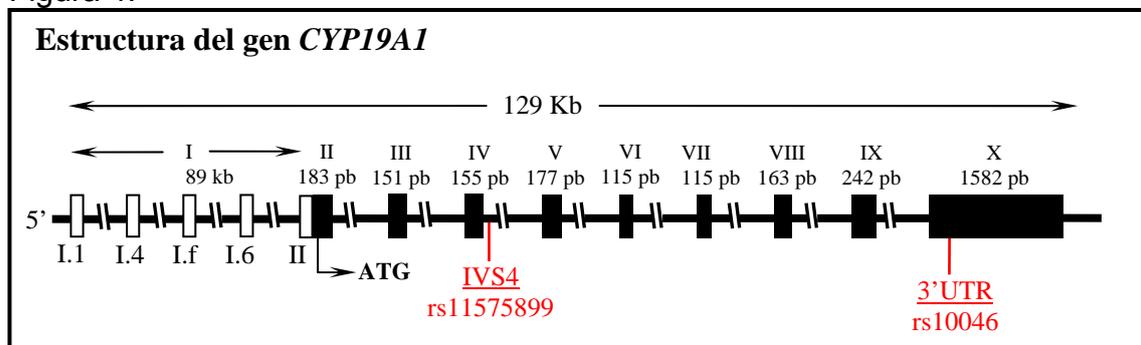


Figura 5.

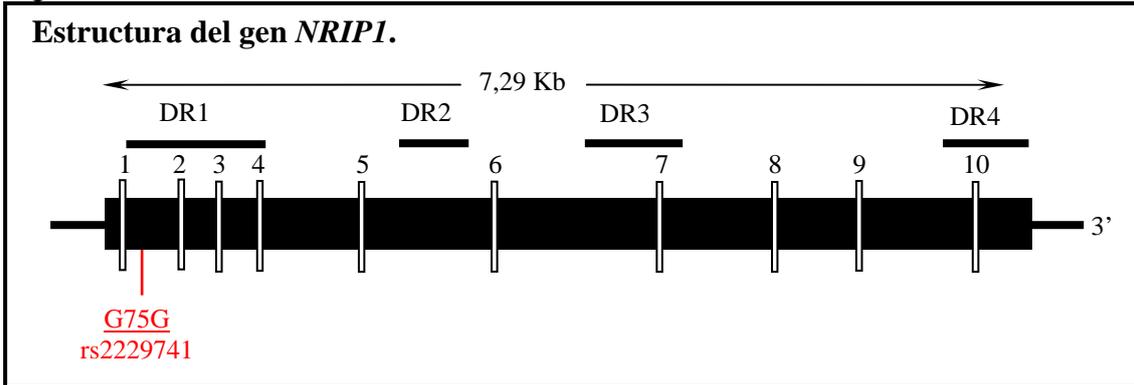
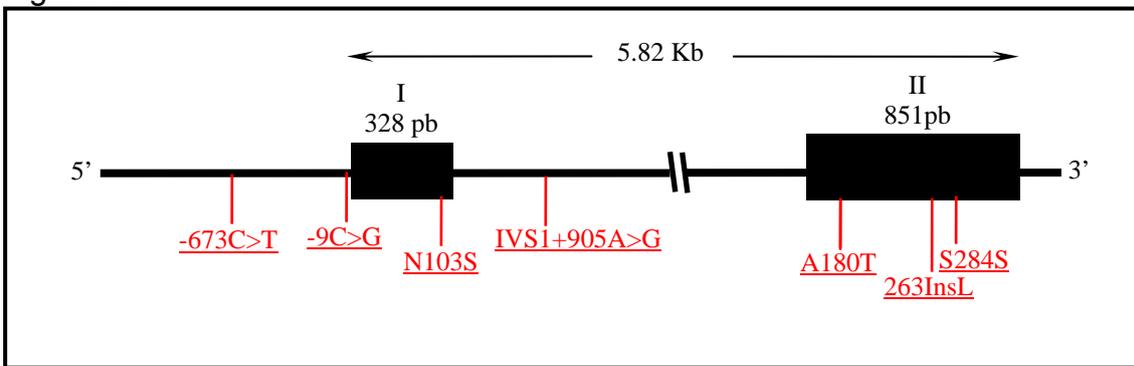


Figura 6.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como puede adivinarse, existen poderosas razones sociales, culturales y médicas que nos incitan a profundizar en el estudio de los factores o variables susceptibles de modificar la duración del periodo fértil de la vida de una mujer. Del análisis de la literatura que acabamos de revisar se desprenden varias impresiones:

En primer lugar, que lo que hemos venido en llamar “periodo fértil”, esto es, el tiempo entre la edad de la menarquia y la edad de la menopausia, viene marcado antropológicamente, y sólo las malas condiciones sociales o de salud pueden modificarlo. En efecto, en los países desarrollados hemos podido comprobar que la edad de la menopausia permanece estable desde hace muchos decenios; y que la edad de la menarquia ha ido descendiendo en la segunda mitad del siglo pasado con la mejora de las condiciones sociales, quedando estancada en los últimos años.

Cuando el retraso o adelanto de cualquiera de estos dos hitos es tan elevado que lo consideramos como “patológico”, puede condicionar, no sólo la fertilidad de la afectada sino también repercutir en otras esferas de su salud.

Esto se observa claramente en las mujeres con menopausia precoz, más susceptibles de padecer los signos y síntomas del hipoestrogenismo y de sufrir a medio o largo plazo alguno de sus procesos invalidantes, como la osteoporosis.

Por último, ambos fenómenos, menopausia y menarquía, tienen una clara vinculación con la endocrinología del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Si la investigación en genética está modificando nuestra concepción de la Medicina en general, esto es mucho más evidente en la Ginecología Endocrina.

En otras palabras, es oportuno investigar si las alteraciones en el genotipo de una mujer pueden condicionar el momento de aparición de aquellos y, en consecuencia, influir sobre su capacidad reproductiva o predisponerla o protegerla de determinadas enfermedades. Máxime si existen trabajos que ya apuntan en este sentido.

En consecuencia, en nuestro trabajo nos planteamos los siguientes Objetivos:

PRINCIPALES

1. Evaluar la relación entre la presencia de polimorfismos genéticos en la ruta metabólica de los estrógenos con la duración de la ventana fértil en nuestra población, en concreto observar si existen polimorfismos genéticos que predispongan a una menor edad de la menarquia o de la menopausia.
2. Determinar si los polimorfismos descritos en la literatura y relacionados con la menopausia precoz están presentes en nuestras pacientes con menopausia precoz.
3. Determinar si la relación entre la presencia de polimorfismos genéticos en la ruta metabólica de los estrógenos con la duración de la ventana fértil es monogénica o si existen interacciones entre genes.

SECUNDARIOS

4. Señalar si los factores de riesgo conocidos de menopausia precoz o menarquia tardía se presentan en nuestras pacientes.
5. Señalar si existen otros factores de riesgo higiénico-dietéticos o características médico-sociales relacionadas con el periodo fértil que no hayan sido notificados en otros estudios epidemiológicos.
6. Señalar si en nuestra población se observa la misma tendencia a disminuir la edad de la menarquia y a mantenerse la edad de la menopausia registrada en los países de nuestro entorno europeo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio corresponde a 1980 mujeres menopáusicas incluidas en un estudio multicéntrico sobre los factores genéticos que influyen en la presentación de la menarquia y la menopausia, donde participaron cinco centros españoles:

- el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada),
- el Hospital San Juan de Alicante (Alicante),
- la Clínica Sanatorio Bilbaíno (Bilbao),
- la Clínica CEOGA (Lugo),
- la Clínica Diatros (Barcelona).

Todas ellas recibieron información detallada sobre el objetivo del estudio, y dieron su consentimiento escrito para participar en él.

Este proyecto recibió la aprobación de los comités éticos de cada hospital involucrado en el estudio.

En todas las participantes se recogió información epidemiológica específica, se obtuvo valor de menarquia y/o menopausia y se obtuvo sangre periférica para análisis genético.

1.1 Criterios de inclusión:

Pacientes menopáusicas que acudieron a las consultas de ginecología en cualquiera de los centros participantes.

1.2 Criterios de exclusión:

Mujeres premenopáusicas y con menopausia artificial (iatrogena, quirúrgica) o pacientes que no cumplimentasen en su totalidad el cuestionario o cuya información genética no fuese obtenida por cualquier causa. Para simplificar el examen estadístico hemos excluido además al grupo de pacientes con menopausia entre los 40 y los 45 años, considerando únicamente las que presentaron menopausia precoz con menos de 40 años y las que tuvieron la última regla por encima de los 45 años.

2. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN

2.1 Recogida de los datos clínicos

Todos los datos clínicos fueron obtenidos usando un cuestionario desarrollado en consenso por los investigadores clínicos implicados en este estudio multicéntrico. Este cuestionario recoge información específica acerca de variables relacionadas con la edad de la menarquia y menopausia (como edad, peso, hábito tabáquico etcétera) así como otras sometidas a estudio. La validez de la población seleccionada y del proceso de recogida de datos queda probada por la coincidencia encontrada entre la importancia de los factores de riesgo ya conocidos en nuestra población y los publicados en la bibliografía general.

2.2 Extracción del ADN

Extraemos ADN genómico de leucocitos en 5 ml de sangre periférica, en un MagNa Pure LC (Roche Diagnostics), utilizando el kit de extracción MagNa Pure LC DNA Isolation kit (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs), se preparan alícuotas de ADN a una concentración de 5 ng/μl y el resto del stock se almacena a -20°C.

A continuación se realiza la amplificación de la cadena de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (técnica PCR) y uso de cebadores específicos diseñados por Neocodex® para la detección específica de los genes a estudio mediante la utilización de los programas Oligo y GeneFisher (disponibles en <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

A partir del programa estadístico SPSS 15.0 se realizó el siguiente análisis de los datos:

Análisis descriptivo: Descripción de los pacientes a estudio calculando medias y desviaciones típicas para las variables cuantitativas normales y medianas y

percentiles para las numéricas no normales. Se calcularon frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas.

Análisis bivalente: A partir de este análisis estudiaremos las posibles relaciones entre las variables dependientes menarquia (<12 años/>= 12 años), menopausia (<40 años/>45 años) y las independientes.

Se aplicó uno u otro test dependiendo del tipo de variable independiente con la que se estudió la relación.

Si las independientes eran dicotómicas (2 categorías) se corrigió el test de la Chi-cuadrado por el de Yates cuando el porcentaje de frecuencia esperada inferior a cinco era del 20% ó menos, en otro caso, la corrección fue a partir del test de Fisher.

En el análisis digénico se calcularon los Riesgos Relativos con sus intervalos de confianza al 95%, para los distintos genes dos a dos.

Si las independientes eran cualitativas de más de dos categorías se contrastó con la Chi-cuadrado y en el caso de haber más de un 20% de celdas con frecuencia esperada inferior a cinco se intentó corregir agrupando categorías.

Cuando las independientes fueron numéricas, primeramente se estudio la normalidad de éstas a partir del contraste de Kolmogorov-Smirnov para, posteriormente, aplicar el test de la T-Student o la U-Mann Whitney según fuese o no la variable normal, respectivamente.

Se tomaron valores estadísticamente significativos con $p < 0,05$.

4. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

4.1 Variables epidemiológicas

Edad: Esta variable hace referencia a la edad de la paciente en años en el momento de su participación en el estudio.

Peso: Peso en kilogramos de la paciente en el momento del estudio.

Talla: Altura en centímetros de la paciente en el momento de participación en el estudio.

Edad de la menarquia: Edad en años de aparición de la primera menstruación en la paciente.

Edad de la menopausia: Edad en años del cese de la menstruación.

Causa de la menopausia: Variable cualitativa que recoge la naturaleza quirúrgica (o iatrogénica) o natural de la menopausia.

Fumadora: Variable cualitativa dicotómica que recoge la presencia o ausencia de éste hábito tóxico en la paciente en el momento del estudio. Se define a la paciente como fumadora si consume cualquier cantidad de tabaco.

Bebedora: Variable cuantitativa que recoge la ingesta de bebidas alcohólicas a lo largo de una semana en la paciente en el momento del estudio.

Consumo de verdura: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de verdura de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de Pescado: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de pescado de cualquier tipo consumidas a la semana por la paciente.

Consumo de lácteos: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de leche y / o derivados de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de carne roja: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de carne roja de cualquier tipo consumidas a la semana por la paciente.

Consumo de cereales: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de cereales de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Consumo de conservas: Variable cuantitativa que recoge el número medio de raciones de conservas de cualquier tipo consumidas al día por la paciente.

Actividad física: Variable cualitativa que recoge el tipo de ejercicio físico que realiza la paciente. Se establecen 3 categorías en función de la intensidad del mismo: sedentarismo, sólo el ejercicio físico propio de las tareas domésticas, practica deporte regularmente.

Número de días de ejercicio físico: Variable cuantitativa que recoge el número medio de días de ejercicio físico que realiza la paciente a la semana.

Tipo de distribución grasa: Variable cualitativa que recoge el patrón de distribución grasa de la paciente en androide (predominio en región abdominal), ginecoide (predominio en región glútea y miembros inferiores) o ninguna en particular (si no destaca ninguna de las distribuciones).

4.2 Variables genéticas

Se define un polimorfismo de un gen como una variación en la secuencia de ADN de ese gen. Estas variaciones en la mayoría de las ocasiones no tienen repercusión fenotípica porque no afectan a la región codificante del gen. Las variaciones pueden consistir en cambios de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism* o SNP), repeticiones de una secuencia determinada de ADN (*Variable Number of Tandem Repeats* o VNTR) o aparición de secuencias de ADN que son cortadas por nucleasas determinando una transcripción errónea llamados polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Conceptualmente, la diferencia entre un polimorfismo, especialmente un SNP, y una mutación es que el polimorfismo afecta al menos al 1% de la población. Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de FSH (FSHR): Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen FSHR. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina- Asparragina (AA), Asparragina-Serina (AS) y Serina-Serina (SS).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de estrógenos tipo 1 (ESR1): Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen ESR1. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Citosina-Citosina (CC), Timina-Citosina (TC) y Timina-Timina (TT).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen del receptor de estrógenos tipo 2 (ESR2): Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen ESR2. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina-asparragina (AA), Guanina-Asparragina (GA) y Guanina-Guanina (GG).

Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) del gen CYP 19 marcador IVS4: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo

debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen CYP19, marcador IVS4
En este gen se han identificado 3 polimorfismos: 11.00, 12.00 y 13.00.

Polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) del gen CYP 19, marcador UTR3´: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen CYP19, marcador UTR3´.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen NRIP1: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen NRIP1. En este gen se han identificado 3 polimorfismos: Asparragina-asparragina (AA), Guanina-Asparragina (GA) y Guanina-Guanina (GG).

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen BMP 15 marcador 9C>G: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen BMP 15 en la posición 9.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen BMP 15 marcador - IVS1+905 A>G.: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido del gen BMP 15 en la posición 905.

Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen BMP 15 marcador A180T: Variable cualitativa que expresa la variación en el ADN en un individuo debida a la sustitución de un único nucleótido en el gen BMP 15 en la posición 180.

5. DETERMINACIONES GENÉTICAS

En total se evaluaron once polimorfismos de los 6 genes candidatos.

Lista de genes y marcadores analizados (incluidos en rojo en las figuras de sus correspondientes genes) en la presente tesis doctoral:

Gen	Nombre Completo	Localización Cromosómica	Locus ID	OMIM	Marcador	rs
<i>FSHR</i>	Follicle Stimulating Hormone Receptor	2p16.3	2492	136435	S680N	6166
<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	6q25.1	2099	133430	Pvull	2234693
<i>ESR2</i>	Estrogen Receptor 2	14q23.2	2100	601663	*39A>G	4986938
<i>CYP19A1</i>	Cytochrome P450, Family 19, Subfamily A, Polypeptide 1	15q21	1588	107910	IVS4 3'UTR	11575899 10046
<i>NRIP1</i>	Nuclear Receptor Interacting Protein 1	21q11.2	8204	602490	G75G	2229741
<i>BMP15</i>	Bone Morphogenetic Protein 15	Xp11.2	9210	300247	-673C>T -9C>G N103S IVS1+905A>G A180T	- 3810682 - 3897937 -

La genotipación se fue haciendo de forma progresiva de manera que el número de pacientes que fueron estudiadas para cada polimorfismo fue el siguiente:

Gen FSHR: 727 participantes en el estudio de menarquia, 557 en el estudio de menopausia.

Gen ESR1: 717 participantes en el estudio de menarquia, 550 en el estudio de menopausia.

Gen ESR2: 726 participantes en el estudio de menarquia, 556 en el estudio de menopausia.

Gen CYP19A1, marcador IVS4: 1166 participantes en el estudio de menarquia, 903 en el estudio de menopausia.

Gen CYP19A1, marcador 3'UTR: 1167 participantes en el estudio de menarquia, 903 en el estudio de menopausia.

Gen NRIP1: 726 participantes en el estudio de menarquia, 557 en el estudio de menopausia.

Gen BMP15, marcador 673C>T: 1166 participantes en el estudio de menarquia, 902 en el estudio de menopausia.

Gen BMP15, marcador -9C>G: 1167 participantes en el estudio de menarquia, 903 en el estudio de menopausia.

Gen BMP15, marcador 103S: 1166 participantes en el estudio de menarquia, 902 en el estudio de menopausia.

Gen BMP15, marcador 905A>G: 1167 participantes en el estudio de menarquia, 903 en el estudio de menopausia.

Gen BMP15, marcador A180T: 1113 participantes en el estudio de menarquia, 884 en el estudio de menopausia.

RESULTADOS

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

Tabla I. Origen de las pacientes: (n=1980)

	N	%
Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)	1213	61,3
Hospital Universitario San Juan (Alicante)	286	14,4
Clínica Sanatorio Bilbaíno (Bilbao)	288	14,5
Clínica CEOGA (Lugo)	135	6,8
Clínica Diatros (Barcelona)	58	2,9
Total	1980	100,0

	N	%
Granada	1065	53,8
Resto de provincias andaluzas	100	5,1
Resto de provincias españolas	815	41,1
Total	1980	100,0

Grafico 1. Origen de las pacientes.

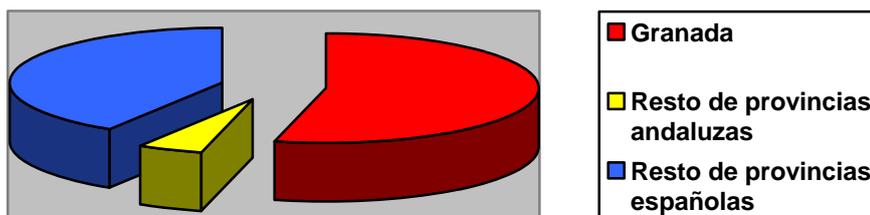


Tabla II. Edad de la menarquia y edad de la menopausia.

	EDAD DE LA MENARQUIA (AÑOS)	EDAD DE LA MENOPAUSIA (AÑOS)
N	1946	1916
Media	12,73	47,46
Desv. típ.	1,585	5,730
Mínimo	6	13
Máximo	19	83

Edad de la menarquia agregada

	n	%
< 11 años	150	7,6
11 a 12 años	761	38,5
> 12 años	1064	53,9
Total	1975	100,0

Edad de la menopausia agregada

	n	%
< 40 años	167	8,7
40 a 45 años	428	22,3
> 45 años	1321	68,9
Total	1916	100,0

Grafico 2.1. Edad de la menarquia.

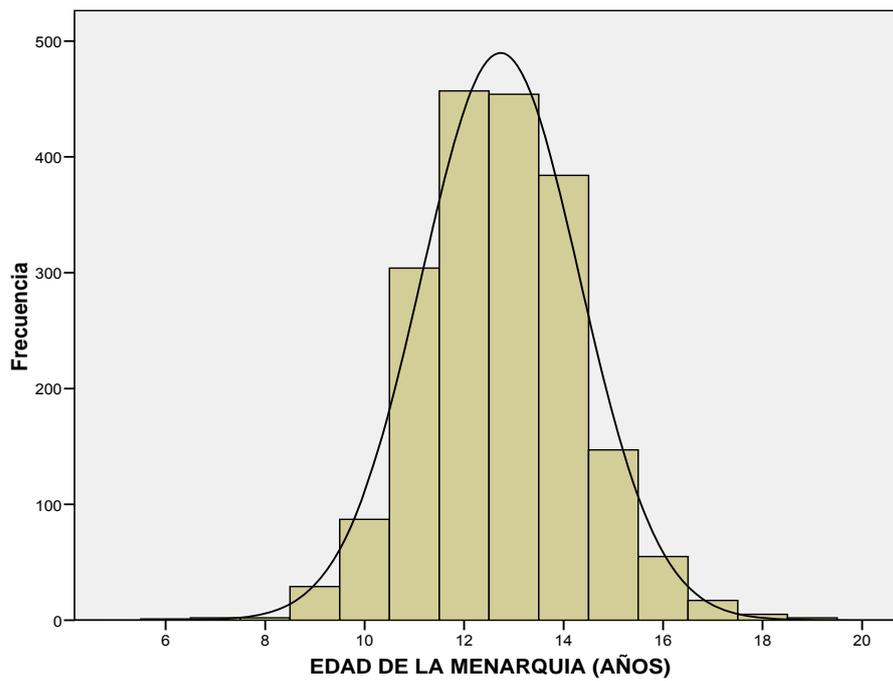


Grafico 2.2. Edad de la menopausia.

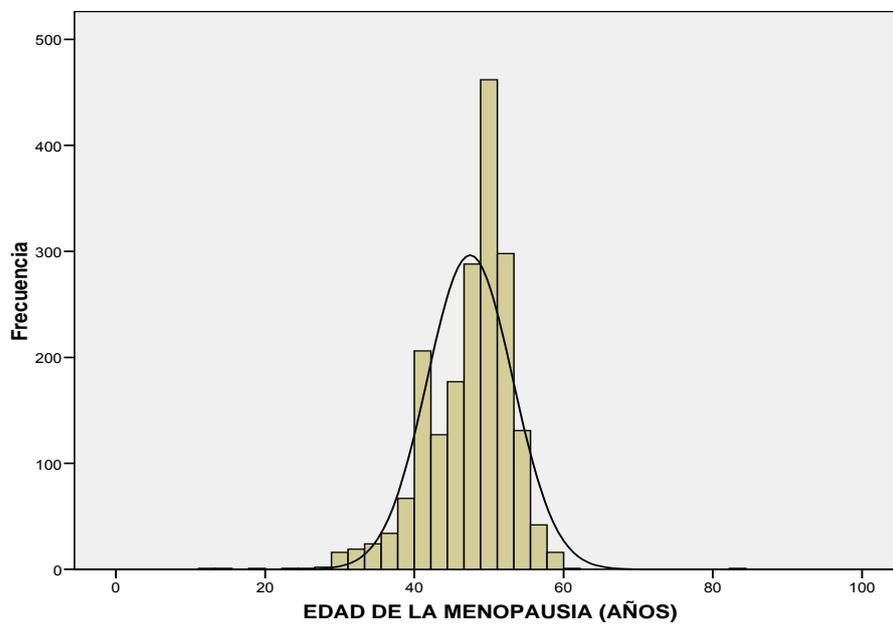


Tabla III a. Edad de menarquia, Edad de menopausia, Ventana fértil.

Año de nacimiento recodificado		EDAD DE LA MENARQUIA (AÑOS)	EDAD DE LA MENOPAUSIA (AÑOS)	VENTANA FÉRTIL (AÑOS)
< 1930	N	62	60	59
	Media	13,21	47,13	33,85
	Desv. típ.	1,700	6,668	6,459
	Mínimo	10	28	16
	Máximo	18	57	45
1930-1939	N	401	403	393
	Media	13,08	47,94	34,85
	Desv. típ.	1,725	5,718	5,794
	Mínimo	7	19	7
	Máximo	19	61	47
1940-1949	N	816	812	802
	Media	12,67	48,75	36,09
	Desv. típ.	1,552	5,324	5,422
	Mínimo	6	29	17
	Máximo	19	83	68
1950-1959	N	597	584	580
	Media	12,55	46,39	33,84
	Desv. típ.	1,459	4,784	4,937
	Mínimo	9	29	15
	Máximo	18	56	44
≥ 1960	N	68	56	56
	Media	12,50	36,91	24,64
	Desv. típ.	1,723	6,634	6,694
	Mínimo	8	13	0
	Máximo	16	45	33

Grafico 3: relación entre la edad de la menarquia y los años de nacimiento.

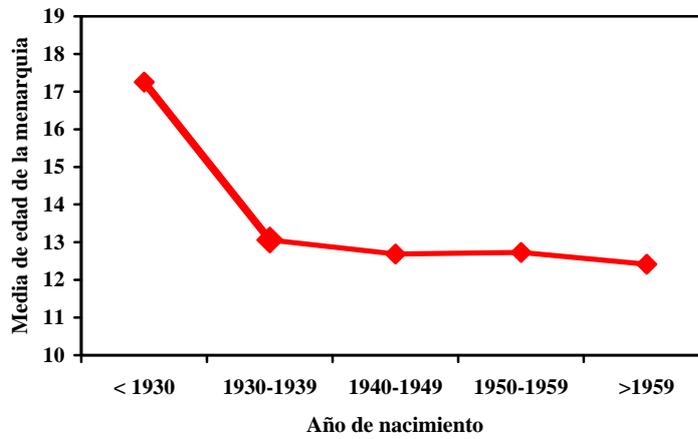


Grafico 4: relación entre la edad de la menopausia y los años de nacimiento.

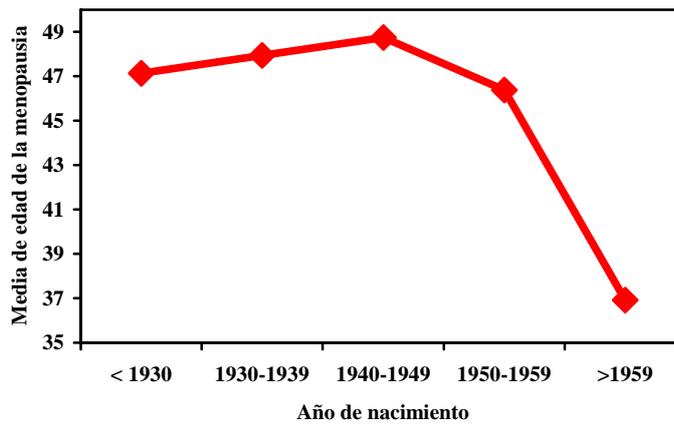


Grafico 5: relación entre la ventana fértil y los años de nacimiento.

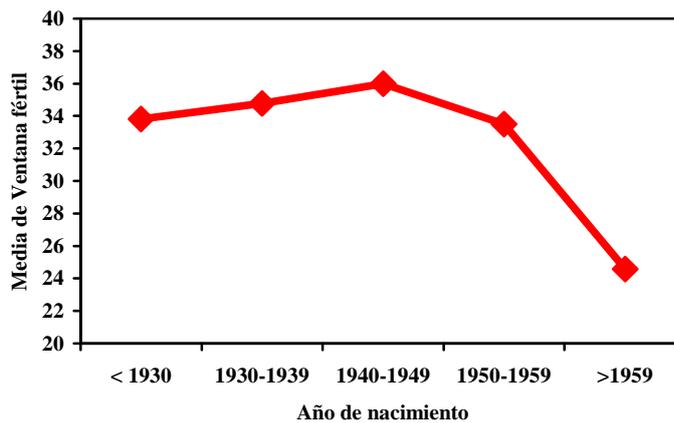


Tabla III b. Talla, IMC.

Año de nacimiento		TALLA (CM)	IMC
< 1930	N	63	63
	Media	153,54	27,2716
	Desv. típ.	6,405	4,24603
	Mínimo	138	18,13
	Máximo	168	37,06
1930-1939	N	402	401
	Media	155,65	27,7545
	Desv. típ.	6,573	4,60126
	Mínimo	138	15,06
	Máximo	170	45,61
1940-1949	N	816	812
	Media	157,17	27,0336
	Desv. típ.	6,048	4,44241
	Mínimo	140	17,71
	Máximo	178	62,44
1950-1959	N	594	590
	Media	158,40	26,2375
	Desv. típ.	5,997	4,64703
	Mínimo	142	15,99
	Máximo	181	44,54
>= 1960	N	65	65
	Media	160,94	23,7511
	Desv. típ.	6,830	4,50698
	Mínimo	145	16,69
	Máximo	175	39,54

Grafico 6: relación entre la talla y los años de nacimiento.

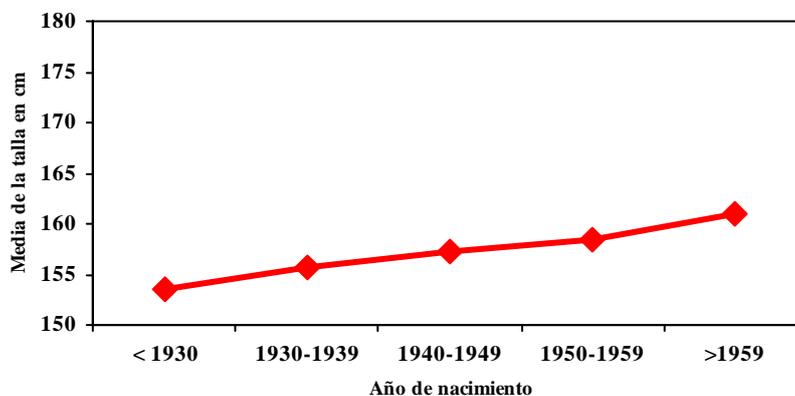


Tabla III c. Paridad - Fetos vivos.

<1930	N	60
	Mediana	3,00
	Percentiles 25	1,00
	75	4,00
1930-1939	N	387
	Mediana	3,00
	Percentiles 25	2,00
	75	4,00
1940-1949	N	791
	Mediana	2,00
	Percentiles 25	2,00
	75	3,00
<1930	N	60
	Mediana	3,00
	Percentiles 25	1,00
	75	4,00
1950-1959	N	572
	Mediana	2,00
	Percentiles 25	1,00
	75	3,00
≥1960	N	62
	Mediana	2,00
	Percentiles 25	1,00
	75	2,00

Grafico 7: relación entre la paridad y los años de nacimiento.

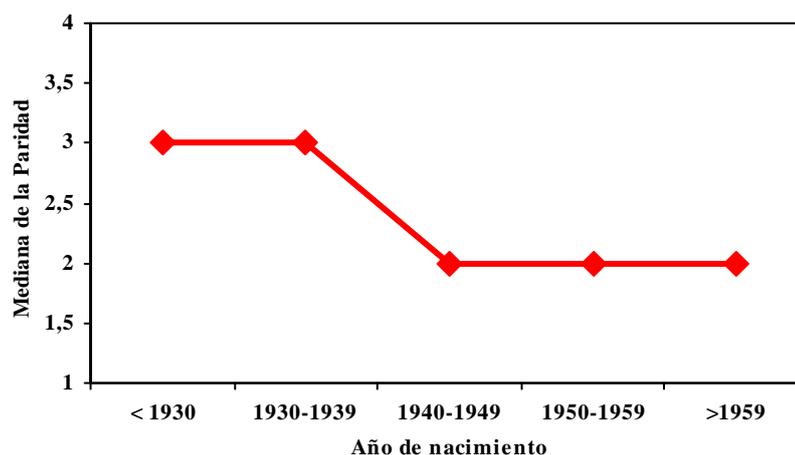


Tabla IV. Variables antropométricas (I).

	Edad	PESO (KG)	TALLA (CM)	IMC
N	1977	1944	1940	1931
Media	74,54	66,22	157,24	26,8374
Desv. típ.	379,907	11,237	6,324	4,59910
Mínimo	23	39	138	15,06
Máximo	12007	170	181	62,44

Tabla V. Variables antropométricas (II).

Tipo de distribución de grasa

	n	%
Androide	338	17,4
Ginecoide	743	38,4
Ninguna en especial	856	44,2
Total	1937	100,0

Tabla VI. Características Obstétricas.

	PARIDAD - EMBARAZOS	PARIDAD - FETOS VIVOS	PARIDAD - ABORTOS
N	1958	1874	1948
Mediana	2,00	2,00	,00
Percentiles 25	2,00	2,00	,00
75	4,00	3,00	1,00

En la tabla VI en vez de medias y desviaciones típicas hemos calculado la mediana con sus percentiles porque las variables no se distribuyen normalmente.

La mediana es el valor que se encuentra en el medio una vez los valores de la variable se ordenan de menor a mayor, por ello la interpretación es: que el 50% de las mujeres tienen menos de 3 embarazos, menos de 2 fetos le viven y no han tenido ningún aborto.

Los percentiles 25 y 75 se leen igual que la mediana que corresponde al percentil 50 y representan su "intervalo".

Tabla VII. Hábitos tóxicos.

Tabaquismo

	n	%
No fuma	1422	72,3
1 a 15 cigarrillos al día	323	16,4
> 15 cigarrillos al día	221	11,2
Total	1966	100,0

Consumo de bebidas alcohólicas

	n	%
No consume	1389	70,3
Fines de semana	562	28,5
Diariamente	24	1,2
Total	1975	100,0

Tabla VIII. Hábitos dietéticos.

	N	Mediana	Percentiles	
			25	75
VECES QUE COME VERDURAS AL DÍA	1976	1,00	1,00	2,00
VECES QUE COME FRUTA AL DÍA	1977	2,00	1,00	3,00
VECES QUE COME CEREALES AL DÍA	1975	1,00	,00	1,00
VECES QUE COME CONSERVAS AL DÍA	1972	,00	,00	,00
VECES QUE COME LÁCTEOS AL DÍA	1969	2,00	1,00	3,00
VECES QUE COME CARNE ROJA A LA SEMANA	1975	1,00	,00	2,00
VECES QUE COME PESCADO A LA SEMANA	1967	2,00	2,00	3,00

Tabla IX a. Ejercicio físico. Frecuencia.

Nº DÍAS DE LA SEMANA QUE HACE DEPORTE

N		1056
Mediana		5,00
Percentiles	25	3,00
	75	7,00

En esta tabla en vez de medias y desviaciones típicas hemos dejado la mediana con sus percentiles porque las variables no se distribuyen normalmente.

Tabla IX b. Tipo de ejercicio físico.

	n	%
Practica ejercicio físico (deporte) regularmente	1091	55,7
Sedentarismo	314	16,0
Sólo el ejercicio propio de sus tareas domésticas	552	28,2
Total	1957	100,0

2. INFERENCIA ESTADÍSTICA.

Tabla X. Talla, Peso, IMC entre los años de la menarquia.

Edad de la		TALLA (CM)	PESO (KG)	IMC
< 11 años	N	142	145	142
	Media	156,85	68,32	27,7577
	Desv. típ.	7,073	12,498	4,87484
	Mínimo	141	44	18,73
	Máximo	175	120	43,03
11 a 12 años	N	746	748	743
	Media	156,85	66,94	27,2459
	Desv. típ.	6,100	11,118	4,58748
	Mínimo	138	39	16,69
	Máximo	174	142	54,11
> 12 años	N	1048	1047	1042
	Media	157,54	65,44	26,4383
	Desv. típ.	6,335	11,074	4,52864
	Mínimo	138	40	15,06
	Máximo	181	170	62,44

	TALLA (CM)	PESO (KG)	IMC
Sig. asintót.	,056	,001	,000

Como podemos observar en la tabla X, existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de Peso e IMC en las diferentes edades de menarquia. Los valores, tanto de peso como de IMC, van disminuyendo significativamente según aumenta la edad de la menarquia.

Tabla XI. Relación entre edad menarquia y variables metabólicas.

Tabla XI a. Hipercolesterolemia

Hipercolesterolemia	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	318 20,8%	1213 79,2%	1531 100%
si	105 25,9%	300 74,1%	405 100%
Total	423 21,8%	1513 78,2%	1936 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,030

En esta tabla podemos observar que las mujeres con edades de menarquia menor de 12 años presentaron un porcentaje estadísticamente superior de hipercolesterolemia.

Tabla XI b. Diabetes

Diabetes	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	419 22,0%	1488 78,0%	1907 100%
si	4 13,8%	25 86,2%	29 100%
Total	423 21,8%	1513 78,2%	1936 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,406

Tabla XI c. Hipertensión arterial

HTA	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	352 21,3%	1300 78,7%	1652 100%
si	71 25,0%	213 75,0%	284 100%
Total	423 21,8%	1513 78,2%	1936 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,189

Tabla XI d. Sobrepeso (IMC>25)

Sobrepeso	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	140 19,3%	585 80,7%	725 100%
si	273 23,2%	902 76,8%	1175 100%
Total	413 21,7%	1487 78,3%	1900 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,050

En esta tabla podemos observar que las mujeres con edades de menarquia menor de 12 años presentaron un porcentaje (con tendencia estadística) superior de sobrepeso (IMC>25).

Tabla XI e. Obesidad (IMC>30)

Obesidad	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	412 21,6%	1499 78,4%	1911 100%
si	11 44,0%	14 56,0%	25 100%
Total	423 21,8%	1513 78,2%	1936 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,014

En esta tabla podemos observar que las mujeres con edades de menarquia menor de 12 años presentaron un porcentaje estadísticamente superior de obesidad (IMC>30).

Tabla XII. Relación entre la edad de menarquia y el cáncer mama.

Cáncer de mama	Menarquia		Total
	<12 años	>=12 años	
no	423 22,1%	1488 77,9%	1911 100%
si	6 24,0%	19 76,0%	25 100%
Total	429 21,8%	1507 78,2%	1936 100%

	Sig. asintótica (bilateral)
Corrección por continuidad	,887

Tabla XIII. Estudio de la normalidad de las variables numéricas en cada una de las cohortes a estudio.

Edad de la menopausia		TALLA (CM)	PESO (KG)	IMC
< 40 años	N	162	163	161
	Media	156,60	66,39	27,1393
	Desv. típ.	6,937	11,501	4,79458
	Mínimo	138	43	17,36
	Máximo	172	108	45,49
> 45 años	N	1296	1302	1291
	Media	157,04	66,26	26,9087
	Desv. típ.	6,170	10,929	4,44192
	Mínimo	138	39	15,99
	Máximo	181	170	62,44

Tabla XIV. Paridad - edad de la menopausia

Edad de la menopausia agregada		PARIDAD - EMBARAZOS	PARIDAD - FETOS VIVOS
< 40 años	N	163	156
		4	11
	Mediana	2,00	2,00
	Percentiles 25	1,00	1,00
	75	3,00	3,00
> 45 años	N	1315	1264
		6	57
	Mediana	3,00	2,00
	Percentiles 25	2,00	2,00
	75	4,00	3,00

Las variables de paridad no se distribuye con normalidad, las describimos con su mediana y sus percentiles y para estudiar si están relacionadas con la edad de la menopausia usamos un test no paramétrico como es el de Mann Whitney.

	TALLA (CM)	PESO (KG)	IMC	PARIDAD - EMBARAZOS	PARIDAD - FETOS VIVOS
Sig. asintót. (bilateral)	,387	,980	,554	,002	,000

Como era de esperar, en esta tabla observamos que el mayor número de embarazos y fetos vivos es superior en mujeres que han tenido la menopausia con más de 45 años de edad.

3. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS.

Tabla XV a. Prueba T para comparación de dos medias

Edad menopausia		TALLA (CM)	PESO (KG)	IMC del paciente
< 40 años	N	98	99	97
	Media	156,71	65,08	26,5520
	Desv. típ.	6,712	11,152	4,74438
	Mínimo	138	43	18,13
	Máximo	170	101	45,49
> 45 años	N	788	792	785
	Media	156,72	66,43	27,0930
	Desv. típ.	6,042	10,507	4,23147
	Mínimo	138	42	15,99
	Máximo	173	120	46,99

No existen diferencias estadísticamente significativas entre edad de la menopausia.

Tabla XV b. Distribución grasa - edad menopausia agrupada.

		Edad de la menopausia agrupada		Total
		< 40 años	> 45 años	
TIPO DE DISTRIBUCIÓN DE GRASA	Androide	23 8,9%	234 91,1%	257 100,0%
	Ginecoide	66 11,5%	508 88,5%	574 100,0%
	Ninguna en especial	77 12,1%	559 87,9%	636 100,0%
Total		166 11,2%	1305 88,8%	1471 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,580

No hay diferencias estadísticamente significativas por tipo de grasa dependiendo de la cohorte.

Factores higiénico-dietéticos: Hábitos.

Tabla XVI a. Tabaquismo.

		Edad de la menopausia agregada		Total
		< 40 años	> 45 años	
Tabaco	No fuma	111 10,1%	984 89,9%	1095 100,0%
	1 a 15 cigarrillos al día	34 14,8%	196 85,2%	230 100,0%
	> 15 cigarrillos al día	22 14,5%	130 85,5%	152 100,0%
Total		167 11,3%	1310 88,7%	1477 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,055

Tabla XVI b. Consumo de Bebidas alcohólicas.

		Edad de la menopausia agregada		Total
		< 40 años	> 45 años	
¿CONSUME ALCOHOL	No consume	121 11,6%	921 88,4%	1042 100,0%
	Fines de semana	44 10,3%	383 89,7%	427 100,0%
	Diariamente	2 12,5%	14 87,5%	16 100,0%
Total		167 11,2%	1318 88,8%	1485 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,762

Tabla XVII. Factores higiénico-dietéticos: Dieta.

Edad de la menopausia agregada		VECES QUE COME VERDURAS AL DÍA	VECES QUE COME FRUTA AL DÍA	VECES QUE COME CEREALES AL DÍA	VECES QUE COME CONSERVAS AL DÍA	
< 40 años	N	167	167	167	167	
	Mediana	1,00	2,00	1,00	,00	
	Percentiles	25	1,00	1,00	,00	,00
		75	2,00	3,00	2,00	,00
> 45 años	N	1320	1320	1318	1315	
	Mediana	1,00	2,00	1,00	,00	
	Percentiles	25	1,00	1,00	,00	,00
		75	2,00	3,00	1,00	,00

Edad de la menopausia agregada		VECES QUE COME LÁCTEOS AL DÍA	VECES QUE COME CARNE ROJA A LA SEMANA	VECES QUE COME PESCADO A LA SEMANA	
< 40 años	N	167	166	167	
	Mediana	2,00	1,00	2,00	
	Percentiles	25	1,00	,00	1,00
		75	3,00	2,00	3,00
> 45 años	N	1315	1319	1312	
	Mediana	2,00	1,00	2,00	
	Percentiles	25	1,00	,00	2,00
		75	3,00	2,00	3,00

Realizado el contraste de normalidad podemos asumir que las variables no se distribuyen simétricamente y por eso vamos a usar test no paramétricos para estudiar las posibles diferencias significativas.

	Sig. asintót. (bilateral)
VECES QUE COME VERDURAS AL DÍA	,546
VECES QUE COME FRUTA AL DÍA	,758
VECES QUE COME CEREALES AL DÍA	,640
VECES QUE COME CONSERVAS AL DÍA	,404
VECES QUE COME LÁCTEOS AL DÍA	,808
VECES QUE COME CARNE ROJA A LA SEMANA	,355
VECES QUE COME PESCADO A LA SEMANA	,775

No existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla XVIII a. Actividad física.

		Edad de la menopausia agregada		Total
		< 40 años	> 45 años	
ACTIVIDAD FÍSICA	Practica ejercicio físico (deporte) regularmente	96 11,4%	747 88,6%	843 100,0%
	Sedentarismo	24 10,2%	211 89,8%	235 100,0%
	Sólo el ejercicio propio de sus tareas domésticas	47 11,8%	350 88,2%	397 100,0%
Total		167 11,3%	1308 88,7%	1475 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,820

Tabla XVIII b. Nº DÍAS QUE HACE DEPORTE

Nº DÍAS DE LA SEMANA QUE HACE DEPORTE

< 40 años	N	94
	Media	4,90
	Desv. típ.	1,878
	Mínimo	2
	Máximo	7
> 45 años	N	722
	Media	4,60
	Desv. típ.	1,987
	Mínimo	1
	Máximo	7

	Nº DÍAS DE LA SEMANA QUE HACE DEPORTE
Sig. asintót. (bilateral)	,180

4. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.

Tabla XIX. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE LA FSH (FSHR).

	FSHR			Total
	AA	AS	SS	
Menarquia < 12 años	33 13,9%	82 23,5%	30 21,4%	145 19,9%
>= 12 años	205 86,1%	267 76,5%	110 78,6%	582 80,1%
Total	238 100,0%	349 100,0%	140 100,0%	727 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,015

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 727 participantes en el estudio. De ellas, 145 (19,9%) tuvieron la menarquia con <12 años y 582 (80,1%) con >12 años.

El polimorfismo del gen FSHR más frecuente es el AS, cuya presencia es superior en el grupo de mujeres con menarquia igual o superior a los 12 años (p=0,015).

Tabla XX. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO 1 (ESR1).

	ESR1			Total
	CC	TC	TT	
Menarquia < 12 años	29 18,1%	79 22,3%	35 17,3%	143 19,9%
>= 12 años	131 81,9%	276 77,7%	167 82,7%	574 80,1%
Total	160 100,0%	355 100,0%	202 100,0%	717 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,304

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 717 participantes en el estudio. De ellas, 143 (19,9%) tuvieron la menarquia con <12 años y 574 (80,1%) con >12 años.

El polimorfismo del gen ESR1 más frecuente es el TC, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXI. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE ESR2 (ESR2).

	ESR2			Total
	AA	GA	GG	
Menarquia < 12 años	26 21,1%	72 20,9%	47 18,2%	145 20,0%
>= 12 años	97 78,9%	273 79,1%	211 81,8%	581 80,0%
Total	123 100,0%	345 100,0%	258 100,0%	726 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,679

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 726 participantes en el estudio. De ellas, 145 (20%) tuvieron la menarquia con <12 años y 581 (80%) con >12 años.

El polimorfismo del gen ESR2 más frecuente es el GA, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN CYP19, marcador IVS4.

	IVS4			Total
	11	12	22	
Menarquia < 12 años	106 22,3%	107 19,9%	28 18,4%	241 20,7%
>= 12 años	370 77,7%	432 80,1%	124 81,6%	926 79,3%
Total	476 100,0%	539 100,0%	152 100,0%	1167 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,489

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1167 participantes en el estudio. De ellas, 241 (20,7%) tuvieron la menarquia con <12 años y 926 (79,3%) con >12 años.

El polimorfismo del gen CYP19, marcador IVS4 más frecuente es el 12, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXIII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN CYP19, marcador 3'UTR.

	CYP19-3'UTR			Total
	AA	GA	GG	
Menarquia < 12 años	72 22,8%	117 20,1%	52 19,3%	241 20,7%
>= 12 años	244 77,2%	465 79,9%	217 80,7%	926 79,3%
Total	316 100,0%	582 100,0%	269 100,0%	1167 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,530

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1167 participantes en el estudio. De ellas, 241 (20,7%) tuvieron la menarquia con <12 años y 926 (79,3%) con >12 años.

El polimorfismo del gen CYP19, marcador 3'UTR más frecuente es el GA, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXIV. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN DEL RECEPTOR NUCLEAR INTERACCIÓN DE PROTEINAS TIPO 1 (NRIP1).

	RIP-140			Total
	AA	GA	GG	
Menarquia < 12 años	29 21,2%	67 18,1%	49 22,5%	145 20,0%
>= 12 años	108 78,8%	304 81,9%	169 77,5%	581 80,0%
Total	137 100,0%	371 100,0%	218 100,0%	726 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,401

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 726 participantes en el estudio. De ellas, 145 (20%) tuvieron la menarquia con <12 años y 581(80%) >12 años.

El polimorfismo del gen NRIP1 más frecuente es el GA, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXV. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN BMP15 marcador 673C>T.

	BMP15-673C>T			Total
	CC	TC	TT	
Menarquia < 12 años	159 20,9%	72 20,2%	9 18,4%	240 20,6%
>= 12 años	601 79,1%	285 79,8%	40 81,6%	926 79,4%
Total	760 100,0%	357 100,0%	49 100,0%	1166 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,888

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1166 participantes en el estudio. De ellas, 240 (20,6%) tuvieron la menarquia con <12 años y 926 (79,4%) con >12 años.

El polimorfismo del gen BMP15 más frecuente es el CC, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXVI. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN BMP15, marcador 9C>G.

	BMP15-9C>G			Total
	CC	GC	GG	
Menarquia < 12 años	159 20,9%	72 20,2%	9 18,4%	240 20,6%
>= 12 años	601 79,1%	285 79,8%	40 81,6%	926 79,4%
Total	760 100,0%	357 100,0%	49 100,0%	1166 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,888

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1166 participantes en el estudio. De ellas, 240 (20,6%) tuvieron la menarquia con <12 años y 926 (79,4%) con >12 años.

El polimorfismo del gen BMP15 más frecuente es el CC, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXVII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN BMP15-N103S.

	BMP15-N103S			Total
	AA	AG	GG	
Menarquia < 12 años	216 20,4%	24 22,9%	1 50,0%	241 20,7%
>= 12 años	843 79,6%	81 77,1%	1 50,0%	925 79,3%
Total	1059 100,0%	105 100,0%	2 100,0%	1166 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,496

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1166 participantes en el estudio. De ellas, 241 (20,7%) tuvieron la menarquia con <12 años y 925(79,3%) con >12 años.

El polimorfismo del gen BMP15 más frecuente es el AA, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXVIII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN BMP15 marcador 905A>G.

	BMP15-905A>G			Total
	CC	TC	TT	
Menarquia < 12 años	16 18,6%	92 20,5%	133 21,0%	241 20,7%
>= 12 años	70 81,4%	356 79,5%	500 79,0%	926 79,3%
Total	86 100,0%	448 100,0%	633 100,0%	1167 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,872

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1167 participantes en el estudio. De ellas, 241 (20,7%) tuvieron la menarquia con <12 años y 926 (79,3%) con >12 años.

El polimorfismo del gen BMP15 más frecuente es el TT, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXIX. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENARQUIA Y EL GEN BMP15 marcador A180T.

	A180T2		Total
	GA	GG	
Menarquia < 12 años	1 14,3%	233 21,1%	234 21,0%
>= 12 años	6 85,7%	873 78,9%	879 79,0%
Total	7 100,0%	1106 100,0%	1113 100,0%

	Sig. exacta (bilateral)
Estadístico exacto de Fisher	1,000

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 1113 participantes en el estudio. De ellas, 234 (21%) tuvieron la menarquia con <12 años y 879 (79%) con >12 años.

El polimorfismo A180T del gen BMP15 más frecuente es el GG, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menarquia.

Tabla XXX. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE LA FSH (FSHR).

	FSHR			Total
	AA	AS	SS	
Menopausia < 40 años	22	30	11	63
	12,2%	11,1%	10,3%	11,3%
> 45 años	158	240	96	494
	87,8%	88,9%	89,7%	88,7%
Total	180	270	107	557
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,872

Se ha analizado la presencia de polimorfismos de este gen en un total de 557 participantes en el estudio. De ellas, 63 (11,3%) tuvieron la menopausia con <40 años, 494(88,7%) >45 años.

El polimorfismo del gen FSHR más frecuente es el AS, la presencia de los polimorfismos de éste gen es parecida en los 2 grupos por lo que su aparición no se asocia significativamente con la edad de aparición de la menopausia.

Tabla XXXI. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO 1 (ESR1).

	ESR1			Total
	CC	TC	TT	
Menopausia < 40 años	15 11,9%	30 11,1%	17 11,0%	62 11,3%
> 45 años	111 88,1%	240 88,9%	137 89,0%	488 88,7%
Total	126 100,0%	270 100,0%	154 100,0%	550 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,968

Los polimorfismos de este gen se estudiaron en 550 pacientes. De ellas, 63 (11,3%) tuvieron la menopausia con <40 años, 488(88,7%) con >45 años.

El polimorfismo TC del gen ESR1 es el más frecuente.

Los distintos polimorfismos de este gen no se relacionan con edad de la menopausia, ya que su distribución es similar en los tres grupos.

Tabla XXXII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS TIPO 2 (ESR2).

	ESR2			Total
	AA	GA	GG	
Menopausia < 40 años	12 12,6%	29 11,1%	22 11,1%	63 11,3%
> 45 años	83 87,4%	233 88,9%	177 88,9%	493 88,7%
Total	95 100,0%	262 100,0%	199 100,0%	556 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,908

Los polimorfismos del gen ESR2 se determinaron en un total de 556 pacientes, de las cuales, 63 (11,3%) tuvieron la menopausia con <40 años, 493(88,7%) con >45 años.

El polimorfismo GA es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXIII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN CYP19, marcador IVS4.

	IVS4			Total
	11	12	22	
Menopausia < 40 años	43 11,7%	44 10,6%	14 12,0%	101 11,2%
> 45 años	326 88,3%	373 89,4%	103 88,0%	802 88,8%
Total	369 100,0%	417 100,0%	117 100,0%	903 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,851

Los polimorfismos del gen CYP19, marcador IVS4 se determinaron en un total de 903 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 802 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo 12 es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXIV. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN CYP19, marcador 3'UTR.

	CYP19-3'UTR			Total
	AA	GA	GG	
Menopausia < 40 años	27 10,9%	53 11,8%	21 10,1%	101 11,2%
> 45 años	221 89,1%	395 88,2%	186 89,9%	802 88,8%
Total	248 100,0%	448 100,0%	207 100,0%	903 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,804

Los polimorfismos del gen CYP19, marcador 3'UTR se determinaron en un total de 903 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 802 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo GG es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXV. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN DEL RECEPTOR NUCLEAR INTERACCIÓN DE PROTEINAS TIPO 1 (NRIP1)

	RIP-140			Total
	AA	GA	GG	
Menopausia < 40 años	16	24	23	63
	15,7%	8,4%	13,6%	11,3%
> 45 años	86	262	146	494
	84,3%	91,6%	86,4%	88,7%
Total	102	286	169	557
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,072

Los polimorfismos del gen NRIP1 se determinaron en un total de 557 pacientes, de las cuales, 63 (11,3%) tuvieron la menopausia con <40 años, 494 (88,7%) con >45 años.

Globalmente no existen diferencias estadísticamente significativas, sin embargo el polimorfismo GA es estadísticamente más frecuente en mujeres que han tenido la menopausia en edades superiores a los 45 años ($p=0,0357$).

Tabla XXXVI. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN BMP15, marcador 673C>T.

	BMP15-673C>T			Total
	CC	TC	TT	
Menopausia < 40 años	66	33	2	101
	11,3%	11,8%	5,3%	11,2%
> 45 años	519	246	36	801
	88,7%	88,2%	94,7%	88,8%
Total	585	279	38	902
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,482

Los polimorfismos del gen BMP15, marcador 673C>T se determinaron en un total de 902 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 801 (88,8%) con >45 años. El polimorfismo TT es el más frecuente en esta población. No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXVII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN BMP15, marcador 9C>G.

	BMP15-9C>G			Total
	CC	GC	GG	
Menopausia < 40 años	66 11,3%	33 11,8%	2 5,3%	101 11,2%
> 45 años	519 88,7%	246 88,2%	36 94,7%	801 88,8%
Total	585 100,0%	279 100,0%	38 100,0%	902 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,482

Los polimorfismos del gen BMP15, marcador 9C>G se determinaron en un total de 902 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 801 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo GG es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXVIII. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN BMP15, marcador N103S.

	BMP15-N103S			Total
	AA	AG	GG	
Menopausia < 40 años	90	11	0	101
	11,0%	12,9%	,0%	11,2%
> 45 años	726	74	1	801
	89,0%	87,1%	100,0%	88,8%
Total	816	85	1	902
	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,815

Los polimorfismos del gen BMP15, marcador N103S se determinaron en un total de 902 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 801 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo GG es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XXXIX. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN BMP15, marcador 905A>G.

	BMP15-905A>G			Total
	CC	TC	TT	
Menopausia < 40 años	7 9,9%	42 12,4%	52 10,6%	101 11,2%
> 45 años	64 90,1%	298 87,6%	440 89,4%	802 88,8%
Total	71 100,0%	340 100,0%	492 100,0%	903 100,0%

	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,677

Los polimorfismos del gen BMP15, marcador 905A>G se determinaron en un total de 903 pacientes, de las cuales, 101 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 802 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo CC es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

Tabla XL. RELACIÓN ENTRE LA EDAD DE LA MENOPAUSIA Y EL GEN BMP15, marcador A180T.

	A180T2		Total
	GA	GG	
Menopausia < 40 años	2 33,3%	97 11,0%	99 11,2%
> 45 años	4 66,7%	781 89,0%	785 88,8%
Total	6 100,0%	878 100,0%	884 100,0%

	Sig. exacta (bilateral)
Estadístico exacto de Fisher	,138

Los polimorfismos del gen A180T, marcador IVS4 se determinaron en un total de 884 pacientes, de las cuales, 99 (11,2%) tuvieron la menopausia con <40 años, 785 (88,8%) con >45 años.

El polimorfismo GG es el más frecuente en esta población.

No hay diferencias entre los grupos en función del polimorfismo considerado para este gen.

5. ESTUDIO DE INTERACCIÓN GÉNICA: ANÁLISIS DIGÉNICO.

5.1. Análisis digénico entre genes candidatos de la ruta estrogénica ya relacionados con la menarquia (FSHR, ESR1, ESR2, CYP19).

Tabla XLI. Interacción entre genes FSHR y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - ESR1 TT	1,029	0,534	1,984
FSHR AS - ESR1 TT	1,006	0,536	1,891
FSHR AA - ESR1 TT	1,022	0,614	1,704
FSHR SS - ESR1 TC	0,944	0,546	1,632
FSHR AS - ESR1 TC	0,932	0,551	1,575
FSHR AA - ESR1 TC	1,013	0,658	1,558
FSHR SS - ESR1 CC	1,090	0,602	1,974
FSHR AS - ESR1 CC	1,080	0,610	1,911
FSHR AA - ESR1 CC	1,009	0,634	1,607

Tabla XLII. Interacción entre genes FSHR y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - FSHR SS	0,635	0,330	1,222
ESR2 GG - FSHR AS	0,452	0,240	0,851
ESR2 GG - FSHR AA	1,405	0,807	2,446
ESR2 GA - FSHR SS	0,981	0,577	1,670
ESR2 GA - FSHR AS	0,775	0,467	1,287
ESR2 GA - FSHR AA	1,265	0,848	1,889
ESR2 AA - FSHR SS	0,647	0,351	1,195
ESR2 AA - FSHR AS	0,583	0,320	1,063
ESR2 AA - FSHR AA	1,110	0,650	1,895

Observamos una relación estadísticamente significativa entre menarquia prematura (menor de 12 años) y la interacción del gen FSHR (variante AS) con el gen ESR2 (variante GG) ($p < 0.05$).

Tabla XLIII. Interacción entre genes FSHR y CYP19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - IVS 11	0,854	0,519	1,403
FSHR SS - IVS 12	0,910	0,435	1,907
FSHR SS - IVS 22	0,777	0,366	1,649
FSHR AS - IVS 11	0,858	0,531	1,386
FSHR AS - IVS 12	0,673	0,336	1,348
FSHR AS - IVS 22	0,577	0,284	1,171
FSHR AA - IVS 11	0,995	0,667	1,482
FSHR AA - IVS 12	1,354	0,791	2,316
FSHR AA - IVS 22	1,346	0,772	2,347

Tabla XLIV. Interacción entre genes FSHR y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - CYP AA	0,952	0,545	1,662
FSHR SS - CYP GA	0,794	0,444	1,420
FSHR SS - CYP GG	0,756	0,391	1,461
FSHR AS - CYP AA	0,926	0,541	1,583
FSHR AS - CYP GA	0,707	0,406	1,232
FSHR AS - CYP GG	0,655	0,348	1,231
FSHR AA - CYP AA	1,028	0,654	1,617
FSHR AA - CYP GA	1,123	0,726	1,736
FSHR AA - CYP GG	1,154	0,695	1,917

Tabla XLV. Interacción entre genes ESR1 y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - ESR2 GG	1,209	0,625	2,340
ESR1 TT - ESR2 GA	1,028	0,614	1,724
ESR1 TT - ESR2 AA	1,176	0,629	2,198
ESR1 TC - ESR2 GG	,0734	0,413	1,304
ESR1 TC - ESR2 GA	0,845	0,553	1,291
ESR1 TC - ESR2 AA	0,869	0,499	1,512
ESR1 CC - ESR2 GG	1,648	0,898	3,023
ESR1 CC - ESR2 GA	1,218	0,763	1,942
ESR1 CC - ESR2 AA	1,353	0,757	2,418

Tabla XLVI. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - IVS 11	1,176	0,709	1,952
ESR1 TT - IVS 12	0,630	0,329	1,208
ESR1 TT - IVS 22	0,741	0,379	1,449
ESR1 TC - IVS 11	1,071	0,705	1,628
ESR1 TC - IVS 12	1,052	0,587	1,884
ESR1 TC - IVS 22	1,127	0,617	2,059
ESR1 CC - IVS 11	1,098	0,693	1,740
ESR1 CC - IVS 12	0,599	0,332	1,082
ESR1 CC - IVS 22	0,658	0,359	1,205

Tabla XLVII. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - CYP AA	0,939	0,531	1,663
ESR1 TT - CYP GA	1,140	0,659	1,974
ESR1 TT - CYP GG	1,071	0,563	2,040
ESR1 TC - CYP AA	1,045	0,648	1,684
ESR1 TC - CYP GA	1,093	0,690	1,732
ESR1 TC - CYP GG	1,142	0,669	1,950
ESR1 CC - CYP AA	0,899	0,537	1,505
ESR1 CC - CYP GA	1,043	0,631	1,725
ESR1 CC - CYP GG	0,938	0,521	1,688

Tabla XLVIII. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - IVS4 11	1,207	0,718	2,029
ESR2 GG - IVS4 12	1,058	0,506	2,212
ESR2 GG - IVS4 22	1,278	0,605	2,696
ESR2 GA - IVS4 11	0,957	0,645	1,418
ESR2 GA - IVS4 12	0,975	0,576	1,650
ESR2 GA - IVS4 22	0,933	0,541	1,608
ESR2 AA - IVS4 11	1,262	0,764	2,083
ESR2 AA - IVS4 12	1,086	0,534	2,207
ESR2 AA- IVS4 22	1,370	0,667	2,812

Tabla XLIX. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
CYP AA - ESR2 GG	1,093	0,615	1,944
CYP GA - ESR2 GG	1,237	0,682	2,243
CYP GG - ESR2 GG	1,353	0,697	2,625
CYP AA - ESR2 GA	0,801	0,512	1,254
CYP GA - ESR2 GA	1,194	0,777	1,835
CYP GG - ESR2 GA	0,957	0,580	1,578
CYP AA - ESR2 AA	1,365	0,782	2,382
CYP GA - ESR2 AA	1,036	0,582	1,842
CYP GG - ESR2 AA	1,414	0,740	2,702

En las tablas XLI a XLIX, podemos observar el estudio de interacción digénica entre los polimorfismos de los genes candidatos ya relacionados con la menarquia: FSHR, ESR1, ESR2 y CYP en sus dos variantes estudiadas (IVS4 y UTR3').

Observamos una relación estadísticamente significativa entre menarquia prematura (menor de 12 años) y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen FSHR (variante AS) con el gen ESR2 (variante GG) ($p < 0.05$), Tabla XLII.

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente a la aparición de la menarquia prematura en nuestra población.

5.2. Interacción digénica entre nuevos genes candidatos de la ruta estrogénica (NRIP, BMP15) con la menarquia.

Tabla L. Interacción entre genes NRIP1 y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - NRIP AA	1,484	0,744	2,959
FSHR SS - NRIP GA	1,241	0,740	2,080
FSHR SS - NRIP GG	1,841	0,885	3,830
FSHR AS - NRIP AA	1,599	0,825	3,103
FSHR AS - NRIP GA	1,349	0,820	2,219
FSHR AS - NRIP GG	2,158	1,066	4,367
FSHR AA - NRIP AA	0,928	0,573	1,501
FSHR AA - NRIP GA	0,920	0,600	1,410
FSHR AA - NRIP GG	0,853	0,499	1,459

Observamos una relación estadísticamente significativa entre menarquia prematura (menor de 12 años) y la interacción del gen FSHR (variante AS) con el gen NRIP1 (variante GG) ($p < 0.05$).

Tabla LI. Interacción entre genes NRIP1 y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - NRIP AA	1,108	0,607	2,025
ESR1 TT - NRIP GA	0,994	0,580	1,702
ESR1 TT - NRIP GG	1,102	0,563	2,156
ESR1 TC - NRIP AA	0,898	0,533	1,512
ESR1 TC - NRIP GA	0,905	0,580	1,411
ESR1 TC -NRIP GG	0,812	0,458	1,441
ESR1 CC- NRIP AA	1,235	0,709	2,151
ESR1 CC- NRIP GA	1,099	0,676	1,786
ESR1 CC- NRIP GG	1,356	0,735	2,504

Tabla LII. Interacción entre genes NRIP1 y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - NRIP AA	1,769	0,953	3,285
ESR2 GG- NRIP GA	0,707	0,399	1,253
ESR2 GG- NRIP GG	1,251	0,629	2,487
ESR2 GA - NRIP AA	1,097	0,668	1,799
ESR2 GA - NRIP GA	0,719	0,473	1,092
ESR2 GA- NRIP GG	0,788	0,456	1,365
ESR2 AA - NRIP AA	1,613	0,888	2,931
ESR2 AA - NRIP GA	0,984	0,571	1,695
ESR2 AA- NRIP GG	1,587	0,828	3,041

Tabla LIII. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
IVS 11 - NRIP AA	0,797	0,492	1,292
IVS 12 - NRIP AA	1,280	0,663	2,470
IVS 22 - NRIP AA	1,021	0,513	2,030
IVS 11- NRIP GA	1,007	0,668	1,518
IVS 12- NRIP GA	0,923	0,529	1,610
IVS 22- NRIP GA	0,929	0,525	1,645
IVS 11- NRIP GG	0,803	0,473	1,363
IVS 12- NRIP GG	1,181	0,572	2,442
IVS 22- NRIP GG	0,949	0,445	2,022

Tabla LIV. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
CYP AA - NRIP AA	0,986	0,570	1,706
CYP GA- NRIP AA	0,953	0,566	1,605
CYP GG- NRIP AA	0,939	0,512	1,724
CYP AA - NRIP GA	1,071	0,675	1,700
CYP GA- NRIP GA	0,794	0,501	1,258
CYP GG- NRIP GA	0,850	0,499	1,450
CYP AA- NRIP GG	1,056	0,580	1,922
CYP GA- NRIP GG	0,756	0,422	1,354
CYP GG- NRIP GG	0,799	0,406	1,573

Tabla LV. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador -9C>G).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - NRIP AA	0,837	0,310	2,261
BMP15CG GC - NRIP AA	0,786	0,278	2,223
BMP15CG CC - NRIP AA	1,064	0,653	1,735
BMP15CG GG - NRIP GA	0,892	0,350	2,275
BMP15CG GC - NRIP GA	0,902	0,342	2,379
BMP15CG CC - NRIP GA	0,989	0,654	1,495
BMP15CG GG - NRIP GG	0,746	0,241	2,311
BMP15CG GC - NRIP GG	0,709	0,218	2,304
BMP15CG CC - NRIP GG	1,052	0,615	1,800

Tabla LVI. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador IVS1+905A>G).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - NRIP AA	0,889	0,380	2,082
BMP15AG TC - NRIP AA	0,881	0,550	1,411
BMP15AG CC - NRIP AA	1,009	0,418	2,438
BMP15AG TT - NRIP GA	1,033	0,502	2,123
BMP15AG TC - NRIP GA	1,011	0,678	1,508
BMP15AG CC- NRIP GA	1,022	0,486	2,148
BMP15AG TT - NRIP GG	0,918	0,360	2,343
BMP15AG TC- NRIP GG	0,890	0,531	1,494
BMP15AG CC- NRIP GG	1,031	0,391	2,721

Tabla LVII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - FSHR SS	0,405	0,111	1,480
BMP15CG GC - FSHR SS	0,565	0,149	2,143
BMP15CG CC - FSHR SS	0,717	0,430	1,194
BMP15CG GG - FSHR AS	0,599	0,164	2,182
BMP15CG GC - FSHR AS	0,589	0,155	2,233
BMP15CG CC - FSHR AS	1,017	0,618	1,674
BMP15CG GG - FSHR AA	0,676	0,294	1,553
BMP15CG GC - FSHR AA	0,959	0,404	2,277
BMP15CG CC - FSHR AA	0,705	0,473	1,051

Tabla LVIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - BMP15 CG GG	0,933	0,303	2,877
ESR1 TT - BMP15 CG GC	0,863	0,268	2,783
ESR1 TT - BMP15CG CC	1,081	0,650	1,799
ESR1 TC - BMP15CG GG	0,809	0,317	2,067
ESR1 TC - BMP15CG GC	0,840	0,318	2,221
ESR1 TC - BMP15CG CC	0,963	0,631	1,471
ESR1 CC - BMP15CG GG	1,154	0,429	3,104
ESR1 CC - BMP15CG GC	1,028	0,366	2,883
ESR1 CC - BMP15CG CC	1,122	0,706	1,784

Tabla LIX. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - ESR2 GG	0,625	0,213	1,833
BMP15CG GC - ESR2 GG	0,802	0,261	2,460
BMP15CG CC - ESR2 GG	0,780	0,459	1,324
BMP15CG GG - ESR2 GA	0,917	0,376	2,236
BMP15CG GC - ESR2 GA	1,099	0,435	2,776
BMP15CG CC - ESR2 GA	0,834	0,559	1,244
BMP15CG GG - ESR2 AA	0,682	0,245	1,896
BMP15CG GC - ESR2 AA	0,729	0,252	2,111
BMP15CG CC - ESR2 AA	0,935	0,564	1,549

Tabla LX. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - IVS11	0,880	0,444	1,745
BMP15CG GC - IVS11	0,953	0,469	1,935
BMP15CG CC - IVS11	0,923	0,682	1,251
BMP15CG GG - IVS12	0,974	0,351	2,704
BMP15CG GC - IVS12	0,950	0,331	2,728
BMP15CG CC - IVS12	1,025	0,662	1,588
BMP15CG GG - IVS22	0,857	0,306	2,397
BMP15CG GC - IVS22	0,906	0,313	2,619
BMP15CG CC - IVS22	0,946	0,607	1,476

Tabla LXI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - CYP AA	1,329	0,573	3,085
BMP15CG GC - CYP AA	1,319	0,555	3,136
BMP15CG CC - CYP AA	1,007	0,719	1,412
BMP15CG GG - CYP GA	1,290	0,613	2,713
BMP15CG GC - CYP GA	1,329	0,613	2,880
BMP15CG CC - CYP GA	0,970	0,681	1,384
BMP15CG GG - CYP GG	1,714	0,681	4,314
BMP15CG GC - CYP GG	1,754	0,676	4,553
BMP15CG CC - CYP GG	0,977	0,654	1,460

Tabla LXII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - FSHR SS	2,520	0,905	7,017
BMP15AG TC - FSHR SS	1,129	0,693	1,838
BMP15AG CC - FSHR SS	2,233	0,786	6,347
BMP15AG TT - FSHR AS	1,515	0,542	4,234
BMP15AG TC - FSHR AS	0,854	0,535	1,365
BMP15AG CC - FSHR AS	1,773	0,620	5,073
BMP15AG TT - FSHR AA	1,663	0,853	3,243
BMP15AG TC - FSHR AA	1,321	0,894	1,951
BMP15AG CC - FSHR AA	1,259	0,631	2,511

Tabla LXIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - BMP15AG TT	1,127	0,470	2,701
ESR1 TT - BMP15AG TC	0,884	0,543	1,439
ESR1 TT - BMP15AG CC	1,275	0,518	3,142
ESR1 TC - BMP15AG TT	1,069	0,505	2,263
ESR1 TC - BMP15AG TC	0,893	0,594	1,343
ESR1 TC - BMP15AG CC	1,197	0,554	2,588
ESR1 CC - BMP15AG TT	1,054	0,486	2,288
ESR1 CC - BMP15AG TC	0,990	0,633	1,546
ESR1 CC - BMP15AG CC	1,065	0,477	2,380

Tabla LXIV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - ESR2 GG	1,442	0,594	3,503
BMP15AG TC - ESR2 GG	1,219	0,728	2,040
BMP15AG CC - ESR2 GG	1,183	0,472	2,965
BMP15AG TT - ESR2 GA	1,182	0,585	2,391
BMP15AG TC - ESR2 GA	1,237	0,842	1,817
BMP15AG CC - ESR2 GA	0,956	0,461	1,979
BMP15AG TT - ESR2 AA	1,220	0,525	2,832
BMP15AG TC - ESR2 AA	0,985	0,601	1,614
BMP15AG CC - ESR2 AA	1,238	0,520	2,949

Tabla LXV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - IVS11	1,488	0,860	2,574
BMP15AG TC - IVS11	0,938	0,700	1,257
BMP15AG CC - IVS11	1,587	0,906	2,777
BMP15AG TT - IVS12	0,737	0,347	1,564
BMP15AG TC - IVS12	1,330	0,865	2,047
BMP15AG CC - IVS12	0,554	0,253	1,211
BMP15AG TT - IVS22	1,096	0,526	2,284
BMP15AG TC - IVS22	1,248	0,803	1,939
BMP15AG CC - IVS22	0,879	0,408	1,890

Tabla LXVI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - CYP AA	0,961	0,523	1,766
BMP15AG TC - CYP AA	0,888	0,640	1,231
BMP15AG CC - CYP AA	1,082	0,580	2,019
BMP15AG TT - CYP GA	0,925	0,502	1,705
BMP15AG TC - CYP GA	1,153	0,819	1,623
BMP15AG CC - CYP GA	0,802	0,428	1,505
BMP15AG TT - CYP GG	0,889	0,442	1,787
BMP15AG TC - CYP GG	1,024	0,694	1,511
BMP15AG CC - CYP GG	0,868	0,423	1,783

Tabla LXVII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
A180T GA – IVS 11	2,204	2,038	2,383
A180T GA – IVS 12	4,530	3,860	5,316
A180T GA – IVS 22	0,682	0,123	3,773

En las tablas L a LXVII, podemos observar el estudio de interacción digénica entre los polimorfismos de los nuevos genes candidatos relacionados con la menarquia: NRIP1 y BMP15 (con sus marcadores), tanto entre ellos como con los genes ESR1, ESR2, FSHR, CYP19.

Observamos una relación estadísticamente significativa entre menarquia prematura (menor de 12 años) y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen FSHR (variante AS) con el gen NRIP1 (variante GG) ($p < 0.05$), Tabla L.
- gen BMP 15, marcador A180T (variante GA) con el gen CYP 19 marcador IVS4 (variante 11).

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente a la aparición de la menarquia prematura en nuestra población

5.3. Análisis digénico entre genes candidatos de la ruta estrogénica ya relacionados con la menopausia (ESR1, ESR2, FSHR, CYP19).

Tabla LXVIII. Interacción entre genes FSHR y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - FSHR SS	1,105	0,901	1,355
ESR1 TT - FSHR AS	1,050	0,897	1,230
ESR1 TT - FSHR AA	1,068	0,821	1,389
ESR1 TC - FSHR SS	0,990	0,821	1,193
ESR1 TC - FSHR AS	1,022	0,893	1,169
ESR1 TC - FSHR AA	0,941	0,745	1,189
ESR1 CC - FSHR SS	1,116	0,931	1,338
ESR1 CC - FSHR AS	1,028	0,895	1,180
ESR1 CC - FSHR AA	1,134	0,895	1,437

Tabla LXIX. Interacción entre genes FSHR y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - FSHR SS	0,768	0,595	0,992
ESR2 GG - FSHR AS	0,805	0,672	0,966
ESR2 GG - FSHR AA	1,034	0,766	1,397
ESR2 GA - FSHR SS	0,977	0,832	1,148
ESR2 GA - FSHR AS	0,946	0,844	1,061
ESR2 GA - FSHR AA	1,092	0,881	1,354
ESR2 AA - FSHR SS	0,786	0,613	1,007
ESR2 AA - FSHR AS	0,851	0,710	0,851
ESR2 AA - FSHR AA	0,947	0,712	1,259

Observamos una relación estadísticamente significativa entre la edad de aparición de la menopausia y la interacción del gen ESR2 (variante GG) con el gen FSHR (tanto la variante SS como la variante AS), ($p < 0.05$).

Tabla LXX. Interacción entre genes FSHR y CYP19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - IVS 11	0,976	0,770	1,238
FSHR SS - IVS 12	0,949	0,830	1,086
FSHR SS - IVS 22	0,933	0,801	1,088
FSHR AS - IVS 11	0,948	0,757	1,187
FSHR AS - IVS 12	0,910	0,801	1,034
FSHR AS - IVS 22	0,875	0,755	1,015
FSHR AA - IVS 11	1,030	0,849	1,251
FSHR AA - IVS 12	1,043	0,929	1,171
FSHR AA - IVS 22	1,066	0,929	1,223

Tabla LXXI. Interacción entre genes FSHR y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
CYP AA - FSHR SS	1,011	0,725	1,411
CYP GA - FSHR SS	0,927	0,789	1,088
CYP GG - FSHR SS	0,898	0,679	1,188
CYP AA - FSHR AS	1,011	0,740	1,383
CYP GA - FSHR AS	0,908	0,780	1,055
CYP GG - FSHR AS	0,871	0,670	1,133
CYP AA - FSHR AA	1,000	0,767	1,303
CYP GA - FSHR AA	1,021	0,891	1,171
CYP GG - FSHR AA	1,031	0,817	1,301

Tabla LXXII. Interacción entre genes ESR1 y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - ESR2 GG	1,152	0,789	1,684
ESR1 TT - ESR2 GA	0,951	0,782	1,156
ESR1 TT - ESR2 AA	1,275	0,856	1,900
ESR1 TC - ESR2 GG	0,895	0,630	1,271
ESR1 TC - ESR2 GA	0,935	0,797	1,097
ESR1 TC - ESR2 AA	0,997	0,690	1,440
ESR1 CC - ESR2 GG	1,288	0,917	1,809
ESR1 CC - ESR2 GA	1,017	0,849	1,218
ESR1 CC - ESR2 AA	1,279	0,898	1,821

Tabla LXXIII. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - IVS 11	1,094	0,855	1,400
ESR1 TT - IVS 12	0,975	0,839	1,133
ESR1 TT - IVS 22	1,018	0,852	1,217
ESR1 TC - IVS 11	1,080	0,876	1,332
ESR1 TC - IVS 12	1,030	0,914	1,160
ESR1 TC - IVS 22	1,073	0,926	1,244
ESR1 CC - IVS 11	1,013	0,819	1,253
ESR1 CC - IVS 12	0,948	0,829	1,084
ESR1 CC - IVS 22	0,948	0,815	1,103

Tabla LXXIV. Interacción entre genes ESR1 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - CYP AA	0,841	0,596	1,185
ESR1 TT - CYP GA	1,182	1,000	1,398
ESR1 TT - CYP GG	1,132	0,841	1,523
ESR1 TC - CYP AA	0,969	0,736	1,275
ESR1 TC - CYP GA	1,101	0,945	1,282
ESR1 TC - CYP GG	1,118	0,874	1,430
ESR1 CC - CYP AA	0,868	0,637	1,183
ESR1 CC - CYP GA	1,074	0,936	1,232
ESR1 CC - CYP GG	1,012	0,781	1,312

Tabla LXXV. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - IVS4 11	1,075	0,844	1,369
ESR2 GG - IVS4 12	1,040	0,901	1,199
ESR2 GG - IVS4 22	1,080	0,919	1,269
ESR2 GA - IVS4 11	1,016	0,838	1,231
ESR2 GA - IVS4 12	0,986	0,880	1,104
ESR2 GA - IVS4 22	0,991	0,865	1,136
ESR2 AA - IVS4 11	1,058	0,841	1,332
ESR2 AA - IVS4 12	1,055	0,919	1,211
ESR2 AA- IVS4 22	1,090	0,935	1,270

Tabla LXXVI. Interacción entre genes ESR2 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
CYP AA - ESR2 GG	1,067	0,777	1,464
CYP GA - ESR2 GG	1,115	0,938	1,326
CYP GG - ESR2 GG	1,222	0,934	1,597
CYP AA - ESR2 GA	0,881	0,677	1,146
CYP GA - ESR2 GA	1,074	0,937	1,231
CYP GG - ESR2 GA	1,008	0,799	1,272
CYP AA - ESR2 AA	1,211	0,889	1,650
CYP GA - ESR2 AA	1,038	0,886	1,217
CYP GG - ESR2 AA	1,212	0,937	1,568

En las tablas LXVIII a LXXVI, podemos observar el estudio de interacción digénica entre los polimorfismos de los genes candidatos ya relacionados con la menopausia: ESR1, ESR2, FSHR y CYP en sus dos variantes estudiadas (IVS4 y 3'UTR).

Observamos una relación estadísticamente significativa entre la edad de aparición de la menopausia y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen ESR2 (variante GG) con el gen FSHR (tanto la variante SS como la variante AS), ($p < 0.05$), Tabla LXIX.

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente a la edad de aparición de la menopausia en nuestra población.

5.4. Análisis digénico entre nuevos genes candidatos de la ruta estrogénica relacionados con la menopausia (NRIP1 y BMP15).

Tabla LXXVII. Interacción entre genes NRIP1 y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR SS - NRIP AA	1,214	0,786	1,874
FSHR SS - NRIP GA	1,079	0,903	1,289
FSHR SS - NRIP GG	0,841	0,671	1,053
FSHR AS - NRIP AA	1,199	0,791	1,817
FSHR AS - NRIP GA	1,044	0,881	1,238
FSHR AS - NRIP GG	1,258	0,853	1,856
FSHR AA - NRIP AA	1,012	0,745	1,375
FSHR AA - NRIP GA	1,033	0,902	1,183
FSHR AA - NRIP GG	1,065	0,808	1,405

Tabla LXXVIII. Interacción entre genes NRIP1 y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - NRIP AA	1,153	0,777	1,711
ESR1 TT - NRIP GA	1,063	0,901	1,253
ESR1 TT - NRIP GG	1,244	0,874	1,770
ESR1 TC - NRIP AA	1,089	0,769	1,542
ESR1 TC - NRIP GA	0,958	0,828	1,109
ESR1 TC -NRIP GG	1,001	0,727	1,379
ESR1 CC- NRIP AA	1,059	0,752	1,490
ESR1 CC- NRIP GA	1,109	0,955	1,289
ESR1 CC- NRIP GG	1,242	0,916	1,685

Tabla LXXIX. Interacción entre genes ESR2 y NRIP1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG - NRIP AA	1,455	1,009	2,098
ESR2 GG- NRIP GA	0,837	0,693	1,011
ESR2 GG- NRIP GG	1,019	,732	1,417
ESR2 GA - NRIP AA	1,043	,755	1,440
ESR2 GA - NRIP GA	0,844	0,742	0,960
ESR2 GA- NRIP GG	0,770	0,576	1,030
ESR2 AA - NRIP AA	1,395	,982	1,981
ESR2 AA - NRIP GA	0,992	0,818	1,202
ESR2 AA- NRIP GG	1,323	0,953	1,836

Observamos una relación estadísticamente significativa entre la edad de la menopausia y la interacción del gen NRIP1 (en la variante GA) con el gen ESR2 (en la variante GA), ($p < 0,05$).

Tabla LXXX. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
IVS 11 - NRIP AA	0,935	0,740	1,182
IVS 12 - NRIP AA	1,072	0,947	1,215
IVS 22 - NRIP AA	1,053	0,902	1,231
IVS 11- NRIP GA	1,002	0,824	1,218
IVS 12- NRIP GA	0,991	0,879	1,117
IVS 22- NRIP GA	0,991	0,862	1,138
IVS 11- NRIP GG	0,937	0,726	1,209
IVS 12- NRIP GG	1,063	0,925	1,221
IVS 22- NRIP GG	1,044	0,880	1,238

Tabla LXXXI. Interacción entre genes NRIP1 y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
CYP AA - NRIP AA	1,045	0,766	1,425
CYP GA- NRIP AA	1,037	0,882	1,220
CYP GG- NRIP AA	1,092	0,832	1,432
CYP AA - NRIP GA	0,987	0,754	1,291
CYP GA- NRIP GA	0,897	0,786	1,023
CYP GG- NRIP GA	0,841	0,669	1,056
CYP AA- NRIP GG	1,031	0,738	1,441
CYP GA- NRIP GG	0,930	0,786	1,101
CYP GG- NRIP GG	0,918	0,690	1,219

Tabla LXXXII. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador -9C>G).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - NRIP AA	0,999	0,940	1,062
BMP15CG GC - NRIP AA	0,988	0,860	1,134
BMP15CG CC - NRIP AA	1,022	0,899	1,162
BMP15CG GG - NRIP GA	0,978	0,932	1,025
BMP15CG GC - NRIP GA	0,952	0,860	0,952
BMP15CG CC - NRIP GA	1,008	0,899	1,129
BMP15CG GG - NRIP GG	0,977	0,917	1,040
BMP15CG GC - NRIP GG	0,940	0,817	1,082
BMP15CG CC - NRIP GG	1,030	0,894	1,186

Tabla LXXXII. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador IVS1+905A>G).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - NRIP AA	0,883	0,450	1,732
BMP15AG TC - NRIP AA	0,984	0,768	1,262
BMP15AG CC - NRIP AA	0,909	0,473	1,747
BMP15AG TT - NRIP GA	1,236	0,679	2,250
BMP15AG TC - NRIP GA	1,010	0,816	1,250
BMP15AG CC- NRIP GA	1,205	0,673	2,157
BMP15AG TT - NRIP GG	1,091	0,507	2,350
BMP15AG TC- NRIP GG	0,994	0,758	1,305
BMP15AG CC- NRIP GG	1,094	0,519	2,307

Tabla LXXXIII. Interacción entre genes NRIP1 y BMP 15 (marcador A180T).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
RIP140 GG – A180T GA	2,694	2,276	3,189
RIP140 GA – A180T GA	1,554	1,445	1,671
RIP140 AA – A180T GA	3,059	0,189	49,434

Tabla LXXXIV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - FSHR SS	0,971	0,911	1,034
BMP15CG GC - FSHR SS	0,957	0,841	1,090
BMP15CG CC - FSHR SS	0,962	0,833	1,113
BMP15CG GG - FSHR AS	0,996	0,944	1,052
BMP15CG GC - FSHR AS	0,982	0,870	1,107
BMP15CG CC - FSHR AS	1,029	0,902	1,173
BMP15CG GG - FSHR AA	0,974	0,924	1,027
BMP15CG GC - FSHR AA	0,975	0,874	1,088
BMP15CG CC - FSHR AA	0,936	0,835	1,048

Tabla LXXXV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - BMP15 CG GG	0,992	0,933	1,055
ESR1 TT - BMP15 CG GC	0,950	0,822	1,098
ESR1 TT - BMP15CG CC	1,075	0,939	1,231
ESR1 TC - BMP15CG GG	0,993	0,943	1,046
ESR1 TC - BMP15CG GC	0,983	0,883	1,093
ESR1 TC - BMP15CG CC	1,011	0,897	1,139
ESR1 CC - BMP15CG GG	0,998	0,944	1,056
ESR1 CC - BMP15CG GC	0,967	0,844	1,108
ESR1 CC - BMP15CG CC	1,064	0,945	1,197

Tabla LXXXVI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - ESR2 GG	0,996	0,933	1,064
BMP15CG GC - ESR2 GG	1,006	0,866	1,168
BMP15CG CC - ESR2 GG	0,972	0,844	1,118
BMP15CG GG - ESR2 GA	1,005	0,957	1,054
BMP15CG GC - ESR2 GA	1,038	0,932	1,157
BMP15CG CC - ESR2 GA	0,937	0,841	1,043
BMP15CG GG - ESR2 AA	0,992	0,931	1,056
BMP15CG GC - ESR2 AA	0,969	0,846	1,110
BMP15CG CC - ESR2 AA	1,037	,903	1,192

Tabla LXXXVII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - IVS11	0,989	0,951	1,028
BMP15CG GC - IVS11	0,993	0,918	1,074
BMP15CG CC - IVS11	0,963	0,883	1,049
BMP15CG GG - IVS12	0,988	0,940	1,039
BMP15CG GC - IVS12	0,966	0,873	1,068
BMP15CG CC - IVS12	1,034	0,911	1,174
BMP15CG GG - IVS22	0,977	0,927	1,030
BMP15CG GC - IVS22	0,959	0,865	1,062
BMP15CG CC - IVS22	0,996	0,874	1,134

Tabla LXXXVIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador -9C>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15CG GG - CYP AA	0,999	0,940	1,062
BMP15CG GC - CYP AA	0,988	0,860	1,134
BMP15CG CC - CYP AA	1,022	0,899	1,162
BMP15CG GG - CYP GA	0,978	0,932	1,025
BMP15CG GC - CYP GA	0,952	0,860	0,952
BMP15CG CC - CYP GA	1,008	0,899	1,129
BMP15CG GG - CYP GG	0,977	0,917	1,040
BMP15CG GC - CYP GG	0,940	0,817	1,082
BMP15CG CC - CYP GG	1,030	0,894	1,186

Tabla LXXXIX. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - FSHR SS	1,614	0,754	3,452
BMP15AG TC - FSHR SS	0,985	0,758	1,280
BMP15AG CC - FSHR SS	1,606	0,765	3,373
BMP15AG TT - FSHR AS	1,088	0,506	2,339
BMP15AG TC - FSHR AS	0,950	0,743	1,215
BMP15AG CC - FSHR AS	1,165	0,551	2,462
BMP15AG TT - FSHR AA	1,484	0,864	2,549
BMP15AG TC - FSHR AA	1,037	0,840	1,280
BMP15AG CC - FSHR AA	1,378	0,816	2,327

Tabla XC. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT - BMP15AG TT	1,038	0,511	2,111
ESR1 TT - BMP15AG TC	0,868	0,667	1,130
ESR1 TT - BMP15AG CC	1,260	0,633	2,510
ESR1 TC - BMP15AG TT	1,018	0,555	1,869
ESR1 TC - BMP15AG TC	0,908	0,734	1,123
ESR1 TC - BMP15AG CC	1,167	0,645	2,112
ESR1 CC - BMP15AG TT	1,020	0,548	1,899
ESR1 CC - BMP15AG TC	0,957	0,748	1,224
ESR1 CC - BMP15AG CC	1,080	0,593	1,965

Tabla XCI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - ESR2 GG	0,984	0,469	0,984
BMP15AG TC - ESR2 GG	1,114	0,846	1,466
BMP15AG CC - ESR2 GG	0,853	0,416	1,749
BMP15AG TT - ESR2 GA	1,013	0,582	1,761
BMP15AG TC - ESR2 GA	1,148	0,930	1,418
BMP15AG CC - ESR2 GA	0,839	0,491	1,432
BMP15AG TT - ESR2 AA	0,972	0,474	1,992
BMP15AG TC - ESR2 AA	0,970	0,753	1,250
BMP15AG CC - ESR2 AA	1,017	0,505	2,047

Tabla XCII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - IVS11	1,233	0,808	1,882
BMP15AG TC - IVS11	0,980	0,844	1,137
BMP15AG CC - IVS11	1,259	0,833	1,903
BMP15AG TT - IVS12	0,874	0,473	1,613
BMP15AG TC - IVS12	1,069	0,852	1,341
BMP15AG CC - IVS12	0,800	0,441	1,452
BMP15AG TT - IVS22	1,078	0,590	1,970
BMP15AG TC - IVS22	1,047	0,831	1,319
BMP15AG CC - IVS22	1,007	0,561	1,809

Tabla XCIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador IVS1+905A>G) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
BMP15AG TT - CYP AA	0,883	0,450	1,732
BMP15AG TC - CYP AA	0,984	0,768	1,262
BMP15AG CC - CYP AA	0,909	0,473	1,747
BMP15AG TT - CYP GA	1,236	0,679	2,250
BMP15AG TC - CYP GA	1,010	0,816	1,250
BMP15AG CC - CYP GA	1,205	0,673	2,157
BMP15AG TT - CYP GG	1,091	0,507	2,350
BMP15AG TC - CYP GG	0,994	0,758	1,305
BMP15AG CC - CYP GG	1,094	0,519	2,307

Tabla XCIV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y FSHR.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
FSHR AS – A180T GA	1,403	1,310	1,502
FSHR AA – A180T GA	1,669	1,540	1,810

Tabla XCV. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y ESR1.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR1 TT – A180T GA	2,236	1,946	2,570
ESR1 TC – A180T GA	1,574	1,457	1,700
ESR1 CC – A180T GA	2,155	0,134	34,764

Tabla XCVI. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y ESR2.

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
ESR2 GG – A180T GA	1,477	1,357	1,607
ESR2 GA – A180T GA	2,328	2,081	2,604

Tabla XCVII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y CYP 19 (marcador IVS4).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
A180T GA – IVS 11	2,297	0,207	25,457
A180T GA – IVS 12	0,281	0,017	4,532
A180T GA – IVS 22	0,646	0,058	7,194

Tabla XCVIII. Interacción entre genes BMP 15 (marcador A180T) y CYP 19 (marcador 3'UTR).

	RR	I.C. 95,0%	
		Inferior	Superior
A180T GA - CYP AA	1,547	1,458	1,641
A180T GA - CYP GA	0,477	0,067	3,411
A180T GA - CYP GG	2,147	1,932	2,386

En las tablas LXXVII a XCVIII, se analizan las interacciones entre los nuevos genes candidatos relacionados con la edad de aparición de la menopausia: NRIP1 y BMP15 en sus variantes estudiadas, tanto entre ellos como con los genes FSHR, ESR1, ESR2, CYP19.

Observamos una relación estadísticamente significativa entre la edad de la menopausia y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen NRIP1 (en la variante GA) con el gen ESR2 (en la variante GA), ($p < 0,05$), (Tabla LXXIX).

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente a la edad de aparición de la menopausia en nuestra población.

DISCUSIÓN

1. Consideraciones Generales

En abril de 2003, coincidiendo con el quincuagésimo aniversario del descubrimiento de la estructura del ADN, y sólo tres años después de que se adelantara su primer borrador, se publicó la secuencia completa del genoma humano. Este proyecto culmina un esfuerzo internacional para determinar el genoma humano completo, definido como la suma total de la información genética de nuestra especie contenida en cada célula nucleada del cuerpo; y principia una fase mucho más interesante de aplicación para el diagnóstico y la comprensión de las enfermedades, así como aventura una nueva manera de terapia.

De momento, la Genética Clínica nos permite el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas y la identificación de sujetos con susceptibilidad de padecer enfermedades frecuentes. En los últimos años su dominio se ha extendido al terreno de la Semiología y al de la respuesta a los tratamientos, otorgando un evidente sentido al principio que dice que no hay dos pacientes iguales, y ha dejado la puerta abierta a la nueva dimensión de la Medicina Predictiva y Personalizada.

Los estudios de asociación genética engloban un grupo de técnicas diseñadas para aislar genes y mutaciones génicas involucradas en status biológicos simples (monogénicos) y complejos (multigénicos o poligénicos), como pueden ser enfermedades, cuadros clínicos sindrómicos o efectos adversos y reacciones a fármacos. La elucidación de los genes que se implican en cada situación biológica o status biológico permite obtener pistas sobre la patogénesis, o al menos explicaciones parciales acerca de los mecanismos y del curso de las enfermedades u otros status biológicos. Este conocimiento, en consecuencia, selecciona estrategias potenciales de prevención, y sugiere nuevas dianas de tratamiento¹³¹.

La idea básica subyacente a todos los estudios de asociación genética es que tanto las características fenotípicas normales, rasgos clínicos como las enfermedades son debidas a una interacción o combinación de factores ambientales que operan sobre un fondo genético particular e individual.

Muchas enfermedades comunes se dice que son complejas; esto significa que son poligénicas o multifactoriales o el resultado final de efectos complejos de varios (o muchos) genes interaccionando con los factores ambientales. El abordaje general de los estudios de asociación se realiza mediante el examen sistemático del genoma de individuos “casos” e individuos “controles” con el objeto de encontrar asociaciones estadísticamente significativas entre el rasgo en estudio (presente en casos y ausente en controles) y determinados elementos del genoma de los individuos en estudio que presentan un determinado rasgo.

Las leyes de Mendel de la herencia establecen que los fenotipos se heredan de forma independiente, aunque en la realidad los genes a menudo están ligados entre sí. Esto es, que se coheredan juntos con largos segmentos de ADN. Este fenómeno se denomina desequilibrio de unión (LD) y es muy importante porque esos largos segmentos de ADN, denominados haplotipos, a menudo se asocian con rasgos complejos, incluyendo enfermedades, reacciones adversas a fármacos, etc. que tienen un origen o causa compleja. La existencia de LD significa que los marcadores que pueden genotiparse o caracterizarse a lo largo del genoma, como son los cambios de secuencia de un solo nucleótido (SNPs), a menudo están asociados de una manera muy consistente con otros elementos físicos del ADN adyacentes y que, por ello, los estudios de asociación pueden realizarse mediante el cribado de los marcadores a lo largo del genoma como una estrategia de aislamiento o descubrimiento de loci o un único locus que traza elementos genéticos asociados a un rasgo determinado. Una vez el locus ha sido identificado mediante esta estrategia, podemos emplear el mapa del genoma humano para identificar qué genes están presentes en el área y, posiblemente, qué función tienen. Esto permite establecer hipótesis más refinadas que pueden validarse o comprobarse mediante ensayos de asociación más dirigidos, otros tipos de estudios no genéticos y, finalmente, promover el avance en el conocimiento de la base genética del rasgo en estudio. Desde hace bastantes años se conocen diversas técnicas para realizar estudios de asociación, pero con el desarrollo de las tecnologías de genotipación basadas en ADN, el aislamiento de los SNPs y la finalización del proyecto genoma humano, el volumen de los estudios de asociación genética se ha incrementado de forma considerable.

Existen dos modos fundamentales de abordar los estudios de asociación genética. Uno de ellos se enfoca al estudio de uno o varios genes candidatos. Los genes candidatos son loci seleccionados de antemano, antes de realizar el estudio, sobre la base de una hipótesis de trabajo. Esta hipótesis depende de la situación y conocimiento de las bases moleculares del rasgo o enfermedad en estudio. Ejemplo de abordaje de genes candidatos son aquellos involucrados en la síntesis de enzimas, diferentes receptores, transportadores, factores de crecimiento, u otras biomoléculas que han sido adscritos a una determinada ruta bioquímica que se sospecha que está relacionada en la etiología de una determinada enfermedad.

Estos estudios requieren un importante esfuerzo intelectual por parte de los que los realizan, puesto que las pistas para seleccionar un determinado gen candidato tienen que extraerse de manera muy laboriosa de la literatura. Además, las hipótesis que se construyen pueden ser o no correctas sabiéndose, sólo de manera cierta, al final de una serie de estudios usualmente muy costosos. Como contrapartida, estos estudios permiten enfocar los esfuerzos de investigación a áreas de interés muy circunscritas y particulares del genoma donde se localizan los genes candidatos de interés. De esta manera, este tipo de abordajes usualmente requieren un número de casos y controles relativamente escasos para poder identificar asociaciones estadísticamente significativas. Finalmente, estos estudios pueden servir para validar hipótesis incluyendo aquellas establecidas a partir de estudios de asociación más generales. Sin embargo, el abordaje de genes candidatos está limitado por el propio conocimiento de la enfermedad de en estudio.

La otra estrategia fundamental empleada en los estudio de asociación genética es la identificación de genes empleando el rastreo completo del genoma (“shot gun approach”, estudios de asociación en el genoma completo, etc).

Una de sus herramientas más recurridas recientemente es el uso de los polimorfismos de un gen determinado, entendidos como las variaciones en la secuencia de ADN de este gen. En la mayoría de los casos no tienen repercusión fenotípica porque no afectan a la región codificante del gen, y pueden consistir en cambios de un único nucleótido (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) o en repeticiones de una secuencia determinada de ADN (VNTR, Variable Number of Tandem Repeats). Cuando aparecen secuencias

de ADN cortadas por nucleasas, se provoca un error en la transcripción y pasan a llamarse polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Conceptualmente, la diferencia entre un polimorfismo y una mutación está en que el primero afecta al menos al 1% de la población; especialmente los SNP se consideran una forma de mutación puntual lo suficientemente exitosa evolutivamente como para fijarse en una parte significativa de la población.

Pero la cuestión que aquí subyace es si el periodo fértil de una mujer viene determinado genéticamente, para, a renglón seguido, analizar si tiene interés la determinación de los polimorfismos de los *genes candidatos* o relacionados con los mecanismos que ajustan esta ventana reproductiva. La hemos definido como el periodo teóricamente fértil de una mujer, y que por concepto podríamos delimitar entre la edad de la menarquia y la de la menopausia, aunque en la práctica sabemos que la fertilidad tarda en ser cierta tras la primera menstruación y declina a niveles exiguos años antes del hito menopáusico.

En este sentido, parece universalmente aceptado que la dotación ovocitaria de una mujer viene determinada genéticamente desde que se forma en las primeras semanas de su desarrollo embrionario. Hay razones para pensar que tanto el momento en el que empieza la dominancia folicular (la pubertad) y, en consecuencia, la posibilidad de ser fértil, como el ritmo del reclutamiento folicular, vienen determinados genéticamente. Estas acepciones ofrecen algunas posibilidades a las influencias del ambiente (el *ambiotoma*) en la configuración temporal de la ventana reproductiva, como se ha analizado en la introducción de esta tesis y que serán comentados en otro apartado de esta discusión.

Partimos pues de que el periodo de fertilidad de una mujer queda más o menos circunscrito al tiempo que transcurre entre su menarquia y su menopausia y que viene fuertemente condicionado por su genoma. ¿Por qué entonces un estudio genético sobre las diferencias en el periodo fértil de la población? Por una parte, el conocimiento de que determinadas mutaciones o polimorfismos genéticos puedan adelantar las edades de la menarquia o la menopausia puede ponernos en alerta hacia los posibles riesgos que conlleva cada uno de estos trastornos: desórdenes metabólicos o mayor riesgo de cáncer de mama

en las que sufrieron una pubertad precoz; osteoporosis, enfermedad cardiovascular y procesos neurodegenerativos en las mujeres con menopausia temprana.

En efecto, aunque aceptamos que situaciones “ambientales” como los hábitos dietéticos o el padecimiento de ciertas enfermedades pueden estar muy relacionados con FOP, para comprender la singularidad de este proceso, en tanto distintivo y distinto para cada paciente, es igualmente valiosa la exploración de su genoma.

Por otro lado, y aunque no sea del alcance de este trabajo, es probable que una alteración genética que adelante la edad de la menopausia adelante también el momento de depleción folicular a partir del cual la fertilidad se encuentre significativamente disminuida; y en consecuencia, que su ventana fértil se encuentre también acortada. Es nuestra primera apuesta para el futuro sobre las repercusiones de la Genética Clínica en Reproducción Humana: la posibilidad de predecir cuál será la ventana fértil de una mujer, hasta cuándo puede hacer planificación familiar. Por el mismo camino circulan las tesis que defienden la importancia del conocimiento genético para prever la respuesta a los tratamientos médicos en fertilidad, sobre todo los relacionados con la manera en cómo se produce el reclutamiento folicular y con qué velocidad se deteriora la reserva folicular.

En pocos años de investigación genética con microarrays de ADN han sido muchos los trabajos publicados sobre la asociación de polimorfismos genéticos con el riesgo de padecer determinadas enfermedades y rasgos ginecológicos. En 2002, nuestro grupo planteó la hipótesis de que existen genes involucrados en la producción de estradiol, y en consecuencia, en múltiples enfermedades relacionadas con los estrógenos, e inició la recogida de muestras en 2004 hasta reclutar más de dos mil mujeres postmenopáusicas voluntarias. En ellas, pensamos que la genotipación de estos *genes candidatos* permitiría dar respuesta a preguntas concretas como ¿existe un perfil genético de alta producción endógena de estrógenos?, ¿existe un perfil genético de hipersensibilidad al efecto del estrógeno?, ¿existe un perfil genético inverso al anterior?, ¿cuántos elementos componen cada perfil?, ¿cómo se combinan entre sí?, ¿cómo se combinan con los factores de riesgo clásicos? y ¿qué rutas moleculares son?

Desde entonces hemos observado que determinados polimorfismos en la ruta estrogénica se asocian con enfermedades o procesos ginecológicos como la osteoporosis postmenopáusica, el síndrome de hiperestimulación ovárica, la anovulación o la infertilidad. Los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados han confirmado la validez de nuestra serie para realizar el análisis de genes candidatos asociados a los diferentes fenotipos relacionados con el metabolismo de los estrógenos; y los resultados epidemiológicos obtenidos nos apoyaron firmemente esta asociación.

Además, en trabajos preliminares con menos población que se han publicado o presentado en varios congresos, observamos también una combinación génica (ESR1-ESR2) asociada a la edad de la menarquia y un marcador (el IVS1+905A>G del gen BMP15) asociado a menopausia prematura y a disminución de la ventana reproductiva^{132 133 134}. El propósito de buscar relaciones entre los polimorfismos genéticos y la ventana reproductiva se nos antoja, por tanto, más atrayente, por cuanto aumentamos el tamaño muestral.

El presente estudio pretende ahondar precisamente en el conocimiento de las variantes de los genes relacionados con la duración de la ventana reproductiva para intentar asimilarlas a la lista de factores de riesgo asociados con el FOP o la disminución de la fertilidad. Además, la descripción detallada del grupo de mujeres que participaron en el estudio nos permite conocer la distribución en nuestro medio de esos factores de riesgo de FOP conocidos (hábitos tóxicos, enfermedades concomitantes, tratamientos recibidos) y describir la existencia de otros parámetros desencadenantes o protectores que no se hubiesen estudiado hasta la fecha.

Existen algunas dificultades inherentes al carácter multicéntrico del trabajo que limitan el poder del estudio, como la variabilidad de la población seleccionada, y por tanto de sus costumbres higiénico-dietéticas, más las diferencias que resultan de las determinaciones analíticas. Por ello, hemos intentado minimizarlas mediante la elaboración de un cuestionario detallado, fácil de rellenar y común a los cinco centros¹³⁵ y centralizando el análisis genético en un único laboratorio situado en Sevilla, a donde se enviaron las muestras congeladas antes de su procesamiento. El alto número de participantes, por el contrario, otorga a este estudio un alto poder a la hora de extraer conclusiones.

Por otro lado, el sesgo de memoria de las mujeres puede no ser tan importante, ya que la aparición de la primera y la última menstruación son acontecimientos muy importantes en la vida de una mujer y quedan registrados en cualquier historia ginecológica.

2. Factores ambientales relacionados con la edad de la menarquia y de la menopausia.

2.1. Edad de la menarquia

La edad de la menarquia es un parámetro antropológico y complejo exclusivo de la mujer, intrínsecamente ligado a la exposición estrogénica, y que depende de la interacción de muchos factores, incluyendo algunos elementos ambientales, genéticos y socioeconómicos. Entre los factores reconocidos que la influyen, revisados en la introducción (ver capítulo 2), encontramos la nutrición, el ejercicio, el estatus socioeconómico, los estímulos psicosociales, el lugar de nacimiento (rural o urbano) y la salud general.

Por sí sola, la edad de la menarquia se ha sugerido como factor de riesgo o protección implicado en varias enfermedades, como la osteoporosis, la obesidad, la depresión, el cáncer de mama y el cáncer de endometrio^{136 137 138 139}.

También hemos analizado que la cantidad de tejido graso es importante para el inicio y mantenimiento de la función reproductiva en la mujer, explicando por qué la ganancia de peso acelera y la restricción calórica retrasa el comienzo de las menstruaciones^{140 141}.

Al parecer el adelanto de la menarquia también se ha correlacionado con mayores niveles de estradiol a través de los ciclos menstruales sin conocerse exactamente la razón¹⁴².

En nuestra serie (ver gráfico 2.1), la edad media de la menarquia es de 12,73 años, mientras que la mediana y la moda está a los 13 años. El rango de edad de la población se mueve entre los 7 y los 19 años y el percentil 10 se encuentra a los 11 años. No quedaría muy bien estudiar a las mujeres con una edad de menarquia inferior a 13 años, primero porque está muy cercano a la edad media de nuestra población y segundo porque incluye mujeres hasta del percentil 40. Es por ello, que la menarquia prematura la hemos definido en mujeres con una edad de menarquia inferior a 12 años.

Dos de los objetivos secundarios planteados al inicio de esta tesis hacen referencia precisamente a la epidemiología de la menarquia como primer hito en la ventana o periodo fértil de una mujer:

2.1.1. Disminución de la edad de la menarquia en las mujeres post-menopáusicas españolas a lo largo de las últimas décadas.

Precisando una idea apuntada en el capítulo 2 de la introducción, la edad de la menarquia ha mostrado una tendencia a disminuir en los últimos siglos, aunque no está claro si esta tendencia se ha nivelado o invertido en los últimos años. Esta disminución gradual se ha atribuido sobre todo a las mejoras socioeconómicas experimentadas en las sociedades modernas, pero cabría pensar que, en parte, se deben también a condicionantes de tipo genético.

Existen variaciones geográficas pequeñas en la edad de la menarquia de las mujeres de nuestro entorno: en Europa se ha señalado que la menarquía aparece entre los 8 y los 18 años, siendo la media en Italia de 12.5 años y en Suecia o Dinamarca de 13.6 años. En el trabajo de Eveleth, ya citado entonces⁴⁵, se apunta también a la existencia de diferencias genéticas entre las mismas poblaciones europeas.

Como podemos ver en nuestros resultados, cuando analizamos la relación entre el año de nacimiento y la edad de la menarquia, la edad media de menarquia de las mujeres incluidas en el estudio fue de 12.73 años, parecida a la media de los países mediterráneos de nuestro entorno europeo, principalmente Francia e Italia. Como en esos países, hemos observado también una tendencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) hacia una disminución de la edad de menarquia asociada al año de nacimiento: en promedio, la edad de menarquia disminuyó 0.2 años (73 días) por década como se observa en tabla III y gráfico 3.

2.1.2. Aumento de la talla en las mujeres post-menopáusicas españolas a lo largo de las últimas décadas.

En la relación entre el año de nacimiento y la talla de las mujeres del estudio en la edad adulta, la talla media fue de 157,24 cm. Cuando estratificamos por edad de nacimiento observamos una tendencia positiva de este parámetro. Este aumento fue de 1.5 cm. de promedio por década y resultó estadísticamente significativo ($p < 0.001$). Esta tendencia se observa claramente en el gráfico 6. Hemos observado que por cada año de incremento en la edad

de menarquia la talla se incrementa un promedio de 0.3 cm ($p= 0.01$) en el análisis de regresión lineal.

En definitiva, la tendencia actual en nuestro país parece que continúa ese aumento en la talla y en la disminución en la edad de menarquía que veíamos en otros países vecinos¹⁴³, y como decíamos antes, señalan una mejoría en la nutrición de nuestra población y en la prevención de los factores ambientales que alteran la edad de inicio de la pubertad, permitiendo la adecuada expresión genética que todo ser humano trae consigo desde el momento de su concepción.

2.1.3. Repercusión de la edad de la menarquía en el síndrome metabólico y el cáncer de mama.

Uno de los elementos relacionados con el adelanto del inicio de la pubertad ha sido el aumento del peso observado en los niños. En España, al igual que en el resto del mundo, también se ha observado un aumento del sobrepeso y obesidad infantil, elementos que podrían estar incidiendo en una edad de la menarquia más temprana, y con ello en un inicio de la capacidad reproductiva a menor edad¹⁴⁴.

La asociación entre mayor peso corporal y menarquia temprana también conlleva riesgos metabólicos a largo plazo. Estudios en adultos han determinado que a menor edad de la menarquia existe un mayor riesgo de insulino resistencia, dislipidemia, sobrepeso y aumento de la adiposidad abdominal, mayores cifras de presión arterial y mayor frecuencia de intolerancia a la glucosa^{145 146 147 148 149 150}. Además diferentes estudios han descrito que la menarquia temprana se asocia a consumo precoz de alcohol y tabaco e inicio temprano de la actividad sexual¹⁵¹. Existen razones de tipo conductual que lo justifican y que no nos concierne en nuestro trabajo, pero afloran algunas publicaciones que alertan del incremento de estos procesos precisamente por el adelanto de la menarquía. Como analizábamos en la introducción, la menarquía precoz puede haberse convertido en un nuevo factor de riesgo para el síndrome metabólico.

Por otro lado, el adelanto de la edad de la menarquía ya se consideraba clásicamente como un factor de riesgo para padecer cáncer de mama, dato

que se siguen observando en estudios epidemiológicos recientes¹⁵². Si tenemos en cuenta que los propios parámetros que definen al síndrome metabólico también incrementan el riesgo de cáncer de mama, la precocidad con la menarquía se nos antoja como apunte biográfico doblemente interesante.

En nuestra serie, coincidiendo con lo esperado a la luz de todos estos datos, casi todos los rasgos del síndrome metabólico se encontraron aumentados en las pacientes que presentaron menarquia anterior a los 12 años (ver tablas XI), especialmente la hipercolesterolemia, el sobrepeso y la obesidad. En la tabla X podemos observar también que el aumento del peso y del IMC es mayor conforme menor es la edad de la menarquia.

Sin embargo, en contra de lo esperado, no encontramos diferencias en la presentación de cánceres de mama: el porcentaje de estos cánceres es inferior al de la población general¹⁵³ (0,013 % vs. 0,5), explicable porque nuestra base de datos se nutre de pacientes que acudieron a un cribado poblacional de osteoporosis.

2.3. Edad de la menopausia y ventana reproductiva.

Hacemos hincapié en que la edad de la menopausia natural también está muy relacionada con el bienestar psicológico y físico de la mujer y puede considerarse como factor pronóstico de cómo se desarrolle el envejecimiento. De hecho, la menopausia precoz podría ser un factor de riesgo de algunas enfermedades como la osteoporosis o la enfermedad cardiovascular como hemos revisado en el capítulo 3.

Comoquiera que la edad de la menopausia se ha mantenido estable en nuestro medio (ver tabla III a y gráfico 4), hecho esperable y descrito en casi todos los tratados de Menopausia y Climaterio de los últimos decenios, la ventana reproductiva ha aumentado ligeramente gracias a la presentación más pronta de la menarquia (ver tabla IIIa y gráfico 5).

El problema fundamental de este análisis es que aquellas mujeres nacidas en la década de los sesenta, si fueron incluidas en el estudio en 2003, lo más tarde que pueden haber tenido la menopausia es con 43 años. Por este motivo

los resultados de el últimos grupo están totalmente sesgados al estar “truncada” la edad de menopausia. Pero, insistimos, sí observamos una tendencia en los tres primeros grupos hacia un aumento de la ventana reproductiva, debido fundamentalmente a una disminución de la edad de la menarquia.

3. Factores Genéticos relacionados con la edad de la menarquia y la menopausia

3.1. Edad de la menarquia

La importancia de factores genéticos en el momento de aparición de la menarquia se ha establecido por estudios familiares y de gemelos, específicamente, en estos últimos, estimándose que alrededor del 53% al 74% de la variación en la edad de la menarquia se atribuye a factores genéticos¹⁵⁴.

Desafortunadamente, el aislamiento de los componentes genéticos específicos implicados en rasgos complejos como éste es una tarea desalentadora, y los datos actuales son confusos y escasos. Diversos grupos de investigación han observado una asociación entre diversos genes candidatos (receptores del estrógeno alpha y beta, CYP17 y CYP19, SHGB, IGF1), incluyendo genes implicados en la producción ovárica de estrógeno^{155 156 157 158 159 160 161 162 163 164}.

Específicamente para el gen ESR1 encontramos asociaciones dispares con respecto a la edad de la menarquia, en parte explicables porque se estudian sobre poblaciones de diversas etnias o con distintos marcadores del mismo gen. En nuestra serie, en un estudio previo no encontramos relación entre el marcador rs2234693 ESR1 con la edad de la menarquia¹³⁹, resultado también observado en mujeres japonesas, holandesas y griegas^{165 166 167}. Pero necesitamos controlar otros marcadores del gen ESR1, tales como el XbaI o el rs2077647, previamente asociados con la edad de la menarquia en otras poblaciones europeas, para llegar a conclusiones definitivas sobre la asociación de este gen con la edad de la menarquia en nuestra población^{168 169}.

Con respecto al ESR2, desafortunadamente existe sólo un estudio anterior, en mujeres griegas, donde se haya evaluado el papel del SNP rs4986938 de este gen en la edad de la menarquia. En él, los autores observaron que la menarquía se adelantó siete meses en las portadoras del genotipo AA del polimorfismo rs4986938 comparado con el resto de las mujeres. Curiosamente,

en este trabajo que no se encontró ningún GG homocigotos para este marcador, sólo explicable por una inmigración reciente, por la mortalidad de las portadoras del genotipo GG dentro de esta población o por algún error en la genotipación¹⁶⁹. En nuestra serie, usando un tamaño de muestra mucho mayor, no habíamos encontramos ninguna asociación del genotipo de rs4986938 AA con la edad de la menarquia, probablemente debido a que nuestra población es menos homogénea que la serie griega (hemos incluido a mujeres posmenopáusicas nacidas indistintamente en zonas urbanas y rurales, y recogidas en cinco partes distintas del país). Como habíamos descartado la posibilidad de la endogamia, y nuestras series corresponden perfectamente con la ley de equilibrio de Hardy Weinberg¹³⁵. En consecuencia, las diferencias en los dos trabajos, que se siguen confirmando en éste, pensamos que pueden existir por diferencias en la base genética de las mujeres griegas y las españolas.

En las tablas XIX a XXIX se muestran los genotipos que tendrían cada uno de los dos grupos. El grupo control lo forman las mujeres con una edad de menarquia mayor a 12 años y el grupo de casos, las mujeres con una edad de menarquia menor o igual a 12 años (lo que habíamos definido en nuestra serie como “menarquia prematura”). Como se puede comprobar, el único marcador asociado con la menarquia prematura es el del gen FSHR ($p = 0,015$). Este mismo marcador es el que habíamos visto asociado en el artículo del *Reproductive Science*¹³⁹ donde observamos que las mujeres portadoras tanto del genotipo en heterocigosis (AS) como del genotipo mutante (SS) del gen FSHR, tenían una menor edad media de menarquia, que las portadoras del genotipo silvestre (AA). En esta ocasión, al aumentar la población estudiada, la asociación es algo menor que la encontrada en aquel artículo.

Los genotipos de FSHR, por otra parte, nunca se han evaluado previamente en la edad de la menarquia, por lo tanto, nuestra asociación no puede ser comparada con resultados anteriores y debe ser tomada con cautela.

En relación con el gen de la aromatasa (CYP19), sabemos que forma parte de la superfamilia citocromo P450, lo que lo hace atractivo como gen candidato para diversos procesos estrógeno dependientes. De hecho, alguno de los

polimorfismos estudiados de este gen o de otros genes de esa superfamilia enzimática se ha asociado con adelanto de la edad de la menarquia en algunas poblaciones caucásicas y ha sido objeto incluso de metanálisis^{170 171 172}.

Como en muchas de ellas, nosotros tampoco observamos esta asociación en nuestra serie, que supera en población a la mayoría de las citadas. De nuevo, las diferencias podrían ser explicadas por la distinta selección de los marcadores de este gen en cada estudio. Quizá la asociación encontrada en alguno de aquellos trabajos sea sólo achacable al azar, esto es, se traten de falsos positivos.

3.2. Edad de la menopausia

Como hemos analizado previamente, la edad de menopausia también está considerada como un parámetro complejo que depende de la interacción de múltiples factores medioambientales, alimenticios y genéticos¹⁷³. Desde el punto de vista genético son múltiples y variados los estudios que han indicado que el genoma podría explicar una parte de la variación en la edad de la menopausia^{174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187}.

Muchos de estos artículos resaltan el papel que los estrógenos tienen en la regulación del sistema reproductor de la mujer, y por ello, varios genes candidatos relacionados con el metabolismo estrogénico se han relacionado con la edad de la menopausia.

Uno de ellos, el gen del ESR2, aunque se ha relacionado con la densidad mineral ósea^{188 189 190} el cáncer de mama¹⁹¹ y otras enfermedades estrógeno-dependientes^{192 193}, a nuestro entender, su asociación con la edad de la menopausia no ha sido suficientemente investigada.

3.2.1. Menopausia precoz

Varios grupos investigadores han identificado diferentes alteraciones en diferentes genes (FMR1, FSHR, LHR, FSH-R, LH-R, inhibina A, GALT, AIRE, EIF2B, NOGGIN, POLG, etc.) asociadas a menopausia precoz o temprana¹⁹⁴. En nuestro trabajo, ninguno de los diez SPN estudiados, de forma individual, se asoció significativamente con el FOP, con la excepción del rs2229741 (NRIP1). Si bien la significación estadística fue corta ($p = 0.07$), aparece como un atractivo gen candidato para el estudio de la menopausia precoz. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que la interacción de estos alelos puede contribuir a modificar la edad de presentación de la menopausia y la duración del periodo reproductivo en las mujeres españolas.

3.2.2. Importancia del gen BMP15

El importante papel de BMP15 en el desarrollo folicular y en la tasa de ovulación se puso de manifiesto cuando la Dra. Susan Galoway en el año 2000 dirigió un estudio en el que encontró una relación entre la poliovulación en dos razas de ovejas (Hanna e Inverdale) con una mutación del gen BMP15¹⁹⁵. Este estudio permitió observar una mutación natural en el cromosoma X (FecX^H y FecX^L), donde en las hembras homocigotas para la mutación, no existe una organización de las células foliculares en la etapa primaria, resultando un bloqueo temprano de la foliculogénesis y llegando dichas hembras homocigotas a ser infértiles. Al contrario, las hembras heterocigotas para la mutación, muestran un aumento de la tasa de ovulación con embarazos múltiples¹⁹⁶. Este trabajo convirtió al gen BMP15 en un firme candidato en la selección de genes implicados en los diferentes fenotipos de disfunción ovárica en mujeres. Así, recientemente aparecieron varias publicaciones al respecto que asocian diferentes variantes del gen BMP15 con la predisposición a padecer alguna disfunción en el funcionamiento del ovario, ya sea de forma natural como el FOP^{197 198 199} o provocada por algún tipo de tratamiento médico, como es el caso del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) y sus complicaciones asociadas²⁰⁰. Con todo, tres nuevos estudios han publicado diferentes variantes que afectan tanto a la pro-región como al péptido maduro

de BMP15 en pacientes con FOP^{197 198 199}. El grupo de investigación italiano describió 6 variantes que afectan a la pro-región de BMP15 (4 con cambio de aminoácido, 1 inserción y 1 en la región promotora). Además encontraron 2 nuevas variantes con cambio de aminoácido en una población afroamericana. El grupo de investigación francés describió 6 nuevas variantes (2 con cambio de aminoácido, 1 inserción y 3 que no provocan cambio de aminoácido). Por último, el grupo de investigación indio describió un total de 18 variantes (13 mutaciones con cambio de aminoácido, 1 inserción, 2 sin cambio de aminoácido, 1 en la zona promotora y 1 en la zona flanqueante 3').

Todas estas variantes se encuentran reflejadas en la tabla XCIX y podemos observar que solamente dos de ellas coinciden en las tres poblaciones: A180T e Ins263L, pero a diferencia de la inserción, la variante A180T no aparece en ningún control.

Tabla XCIX. Diferentes variantes publicadas dentro del gen *BMP15* en mujeres con FOP.

LOCALIZACIÓN	VARIACIÓN DEL GEN	VARIACIÓN DE LA PROTEÍNA	Di Pasquale y cols.		Dixit y cols.		Laissue y cols.	
			Controles n=95/116	FOP n=166	Controles n=197	FOP n=133	Controles n=54	FOP n=203
5'UTR	-9C>G	Promotor	61/71.6%	86.7%	24.9%	33.1%	-	-
EXÓN 1	¿?	S5R	-	ND*	-	-	-	-
EXÓN 1	181C>T	R61W	-	-	0.0%	1.5%	-	-
EXÓN 1	182G>A	R61E	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 1	202C>T	R68W	0.0%	0.6%	-	-	-	-
EXÓN 1	226C>T	R76C	-	-	0.0%	2.3%	-	-
EXÓN 1	227G>A	R76H	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 1	308A>G	N103S	9.5/8.4%	6.7%	5.1%	9.8%	-	-
INTRÓN 1	328insG	Intrónica	-	-	1.0%	0.0%	-	-
EXÓN 2	381A>G	Silent	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	443T>C	L148P	-	ND*	-	-	0.0%	0.5%
EXÓN 2	468G>A	Silent	-	-	-	-	0.0%	0.5%
EXÓN 2	538G>A	A180T	0.0%	3.0%	0.0%	0.8%	0.0%	1.0%
EXÓN 2	538G>T	A180F	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	588T>A	N196K	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	617G>A	R206H	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	631C>T	E211X	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	661T>C	W221R	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	704A>G	Y235C	0.0%	0.6%	-	-	-	-
EXÓN 2	727A>G	I243G	-	-	0.0%	0.8%	-	-
EXÓN 2	788insTCT	INS263L	6.0%/0.0%	1.2%	2.0%	3.0%	16.6%	4.9%
EXÓN 2	831C>T	Silent	-	-	-	-	0.0%	0.5%
EXÓN 2	852C>T	Silent	-	-	10.2%	6.8%	0.0%	2.0%
3'UTR	*40dupG	3' UTR	-	-	0.0%	0.8%	-	-

*ND: No disponible. Variante encontrada en población afroamericana con FOP.

Así, nos decidimos a investigar la variante A180T por tres razones principales:

1. Ha sido encontrada en cinco pacientes con FOP y ningún control.
2. Todas las mujeres portadoras de de la variante A180T son pacientes con amenorrea secundaria
3. Ninguno de los cinco casos tienen factores familiares asociados.

Cuando investigamos la presencia de la variante A180T en 1157 mujeres posmenopáusicas (898 de ellas con una menopausia alcanzada de modo natural), observamos su presencia en heterocigosis en 7 mujeres, estableciéndose la frecuencia alélica de esta variante en la población española en un 0.3%. Los datos clínicos de estas 7 mujeres portadoras de la variante en heterocigosis se muestran en la tabla C. Entre estas mujeres, sólo una paciente portadora de la variante ha sido diagnosticada de FOP, otra tuvo una menopausia probablemente causada por una endometriosis, y las otras cinco portadoras de la variante tienen una fertilidad comprobada y la menopausia apareció después de los 40 años.

Tabla C. Cuadro clínico de las pacientes portadoras de la variante A180T del gen *BMP15*

Rasgos fenotípicos	Pacientes portadoras de la variante A180T del gen <i>BMP15</i>						
	83	363	410	477	838	1019	1107
Edad(años)	54	68	49	45	55	59	68
Edad de menarquia (años)	14	14	12	13	13	10	12
Edad de menopausia (años)	46	49	44	35	51	47	35
Causa de menopausia	natural	natural	natural	endometriosis	natural	natural	natural
Periodo reproductivo (años)	32	35	32	22	38	37	23
Embarazo/Aborto/Pretérmino/ Nacido vivo	1/0/0/1	3/0/0/3	4/0/0/4	0/0/0/0	2/0/0/2	3/1/0/2	2/0/0/2
Índice de Masa Corporal	27.0	29.0	24.2	21.1	28.1	37.1	31.2
Distribución de grasa	ninguna especial	ginecoide	ninguna especial	ninguna especial	ninguna especial	ninguna especial	ninguna especial
Fuma	no	no	no	sí	no	sí	no
Consume alcohol	no	sí	no	sí	no	no	no
Antecedentes clínicos	colesterol alto hipertensión osteopenia	hipertensión osteopenia	osteopenia	endometriosis	-	colesterol alto diabetes II osteoporosis	hipertensión diabetes II osteoporosis

Para analizar los parámetros implicados en la edad de menopausia, como son la edad de menarquia, el periodo reproductivo, la paridad y el índice de masa corporal, hemos dividido la población de mujeres con una menopausia natural en dos grupos, según aparezca o no la variante A180T. Nuestros resultados indican que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos en ninguno de los parámetros estudiados ($p > 0.13$, los datos no se muestran). No obstante, hemos observado que dentro de las mujeres portadoras de la variante A180T del grupo A, aparece otra mujer con una edad de menopausia prematura (44 años) y que en general tienen una edad media de menopausia inferior (45.3 ± 5.6 vs. 48.5 ± 5.0) y un periodo reproductivo más corto (32.8 ± 5.4 vs. 35.6 ± 5.1). Es posible que debido a la baja frecuencia alélica de A180T no obtengamos una diferencia estadísticamente significativa en esos estudios.

Adicionalmente, en nuestra población con FOP, hemos confirmado la existencia de algunas de las variantes descritas por los tres grupos investigadores (-9C>G, N103S, Ins263L y S284S), aunque todas ellas han aparecido en la población control con una frecuencia similar (los datos no se muestran).

De entre todas estas variantes, nuestro trabajo se ha centrado en la única que, coincidiendo en tres estudios independientes, hasta la fecha sólo había aparecido en 10 mujeres y todas con una menopausia antes de los 40 años de edad. De éstas, 5 de 166 mujeres italianas con FOP¹⁹⁷, 1 de 133 y 2 de 60 mujeres indias con FOP y amenorrea primaria respectivamente¹⁹⁹ y 2 de 203 mujeres europeas con FOP¹⁹⁶ y sin aparecer en ninguna de las mujeres del grupo control ($n = 462$, tamaño muestral sumado en las tres poblaciones). Por el contrario, en nuestro trabajo hemos encontrado la presencia del alelo A180T en 5 mujeres con menopausia después de los 40 años. Nuestros resultados sugieren que la variante A180T del gen *BMP15* es un alelo de muy baja frecuencia en la población española. Además, al menos en nuestra población, no es suficiente ni necesario para generar un FOP y el hecho de que no apareciera en ningún grupo control publicado hasta la fecha puede deberse a que el número de controles empleado por los autores sea insuficiente para detectar un alelo de baja frecuencia. No obstante, y de acuerdo con el grupo de

investigación italiano, nuestros resultados también confirman que el gen BMP15 puede contribuir a una disminución de la edad de menopausia, aunque esto debe ser visto con precaución.

No tenemos suficientes evidencias con respecto a la existencia de una relación directa entre la variante A180T con la edad de menopausia temprana. No obstante, los últimos hallazgos del papel de BMP15 en la tasa de ovulación en las ovejas junto con su relación con un aumento en la producción de folículos en mujeres sometidas a tratamientos de hiperestimulación ovárica controlada, podría sugerir que este factor ovocitario tendría un importante papel en la foliculogénesis en mamíferos y con ello en la edad de menopausia. De acuerdo con los datos publicados, unos niveles reducidos de BMP15 pueden incrementar la respuesta a FSH por aumento de sus receptores en las células de la granulosa, aumentando los niveles de producción de estrógenos y así incrementando la producción folicular. Además, estos niveles elevados de estrógeno en células de la granulosa activan un potente inhibidor de la expresión de BMP15 en ovocitos (KIT Ligando). Estas mujeres con una elevada producción en el número de folículo por cada ciclo, podrían tener un excesivo gasto de ellos durante su vida reproductiva y con ello una pérdida temprana de la función ovárica.

Esto último, es tan sólo una hipótesis de trabajo, por lo que para una mejor comprensión del papel de BMP15 en la tasa de ovulación en humanos, es necesario un análisis exhaustivo del gen y una caracterización funcional de la proteína con las diferentes variantes halladas en poblaciones mayores e independientes.

En consecuencia, la evidencia de que el gen BMP15 sea determinante para la ovulación en ovejas, junto con su asociación al síndrome de hiperestimulación ovárica, sugiere fuertemente que este factor ovocitario podría jugar un papel importante en la foliculogénesis de los mamíferos, y en consecuencia en la aparición de FOP o menopausia precoz, aunque esta afirmación hay que emitirla con cautela.

3.3. Estudios de interacción génica.

3.3.1. Justificación y precedentes

De una manera individual, las diferentes variantes genéticas de los *loci* que hemos analizado, han sido estudiadas en otras enfermedades relacionadas con los estrógenos. No obstante, los resultados son muy variados y controvertidos, debido acaso a la falta de poder estadístico en el análisis genético, al empleo de diferentes valoraciones clínicas o a la presencia de estratificación genética. Pensamos que además de ellas, otra poderosa razón asienta en que los estudios univariantes ignoran por completo la naturaleza compleja de la ventana reproductiva y la posibilidad de interacción entre las variaciones genéticas entre sí y con los factores ambientales.

A la interacción entre dos genes en la configuración de un fenotipo determinado la conocemos como **interacción digénica**, y depende de la relación existente entre la dotación alélica de cada uno de los genes. En este trabajo, la interacción digénica entre los polimorfismos de los genes candidatos estudiados puede determinarnos a priori distintos fenotipos dentro del metabolismo estrogénico, y condicionar en consecuencia los momentos de la menarquia y la menopausia en una mujer.

Siguiendo esta dirección, nuestro grupo ya se planteó esta posibilidad entre los genes candidatos del actual trabajo en otros procesos ginecológicos. En uno de ellos se observó una interacción entre ESR1 y ESR2 con situaciones como la edad de la menopausia o de la menarquia, confirmando los datos de una población griega¹⁶⁹.

En otro trabajo previo¹³³ observamos dos patrones digénicos fuertemente asociados con osteoporosis postmenopáusica: el ESR1-ESR2 y el ESR2-NRIP1. Este trabajo fue pionero en la inclusión de algunos polimorfismos genéticos en el estudio de esta enfermedad y en la perspectiva de la interacción génica como posibilidad que debe relegar al análisis unilocus en la predicción de otras enfermedades comunes. Descubrir estas interacciones nos

ofrece unas grandes perspectivas de encontrar asociaciones entre genes, tanto los que ya estaban estudiados, como con otros genes candidatos de la ruta estrogénica.

3.3.2. Comentarios sobre nuestros resultados

La dificultad en los estudios de interacción génica en la predicción de enfermedades comunes radica básicamente en la necesidad de una gran población de estudio que permita las comparaciones entre las variantes genéticas. De ahí la escasez actual de publicaciones de esta índole en Ginecología. Además, esta investigación evoluciona hacia formas más complicadas de interacción multigénica, necesitando multiplicar también las poblaciones de estudio. Muy recientemente se está planteado incluso cuál es el método estadístico que mejor pueda cuantificar las implicaciones de estas interacciones²⁰¹.

El punto fuerte de nuestro trabajo es, por tanto, el tamaño de la muestra, que nos permite este tipo de análisis. El reclutamiento de mujeres voluntarias se realizó con la colaboración de otros centros del país para un proyecto que contempla este y otros objetivos. Comoquiera que la interacción génica se plantea como la principal línea de investigación futura, en la tesis que aquí se defiende se quiere empezar a descubrir la interacción digénica con los genes seleccionados.

1. Edad de menarquia

En las comparaciones entre el grupo de casos (edad de menarquia inferior a 12 años) y el grupo control (edad de menarquia superior a 12 años) no hemos podido considerar situaciones más extremas, por ejemplo menarquia inferior a 11 años, porque la cantidad de mujeres en el grupo de casos disminuye y no permite unos adecuados cálculos estadísticos. En futuros trabajos con mayor muestra poblacional sería deseable establecer las comparaciones entre grupos más dispares.

En cualquier caso, en nuestro trabajo, observamos una relación estadísticamente significativa entre lo que hemos establecido como menarquia prematura (menor de 12 años) y la interacción de las siguientes variantes alélicas de los genes estudiados:

- gen FSHR (variante AS) con el gen ESR2 (variante GG) ($p < 0.05$);
- gen FSHR (variante AS) con el gen NRIP1 (variante GG) ($p < 0.05$);
- marcador IVS del gen CYP 19 (variante 11) con el marcador A180T del gen BMP15 (variante GA) ($p < 0.05$).

En un trabajo previo pudimos observar que las frecuencias genotípicas de todos los marcadores genéticos analizados mantienen el equilibrio de HW¹⁴⁰. La determinación del cumplimiento de este principio se usa comúnmente como control de calidad de la genotipación en individuos no relacionados.

Quizá la limitación de este trabajo, y en general la de todos los estudios de interacción génica, sea la necesidad de una significación estadística mucho mayor que la habitualmente establecida. La razón a esta precisión está en que al hacer muchas comparaciones, el azar por sí sólo puede explicar que alguna salga significativa. Por tal motivo debemos tomar con cautela algunas de las interacciones digénicas encontradas, sobre todo aquellas de $p > 0.01$.

2. Edad de menopausia

Para ajustar mejor el examen estadístico hemos excluido en las comparaciones al grupo de pacientes con menopausia entre los 40 y los 45 años, considerando únicamente las que presentaron menopausia precoz con menos de 40 años y las que tuvieron la última regla por encima de los 45. En él se ha empleado un test de regresiones logísticas binarias, valorando que las dotaciones de los dos genes investigados en cada interacción actúan como covariables.

Aunque en la mayoría de los casos, no encontramos relación estadísticamente significativa, sí observamos una interesante relación entre FOP y la interacción de las siguientes variantes alélicas:

- gen ESR2 (en la variante GG) con el gen FSHR (tanto la variante SS como la variante AS), ($p < 0.05$);
- gen NRIP1 (en la variante GA) con el gen ESR2 (en la variante GA), ($p < 0,05$).

El resto de las interacciones entre las dotaciones alélicas de estos genes no se asoció significativamente a la edad de menopausia en nuestra población.

De estos resultados se desprende que los genes ESR2, FSHR y NRIP1, pero más concretamente las interacciones entre ellos, parecen ser los que más relacionados están con la predisposición a la duración de la ventana fértil, por encima de otros genes más estudiados en la literatura (ESR1). No obstante, insistimos en que la importancia global del estudio digénico es limitada ya que sólo un porcentaje pequeño de las interacciones mostró asociación y ésta mostró un nivel de significación escaso.

Es evidente que estos resultados refuerzan dos hipótesis planteadas en relación con el FOP y que nos hemos fijado como objetivos principales: por un lado tenemos datos de que algunos polimorfismos genéticos en la ruta estrogénica están implicados en la duración de la ventana fértil. Esta es la primera referencia también de que las variaciones de los nuevos genes candidatos (NRIP) pueden predisponer al FOP como lo hicieron en otros procesos ginecológicos²⁰².

Por otra parte, tenemos nuevos argumentos para acentuar el carácter complejo y multifactorial de la ventana reproductiva, no sólo en la relación entre factores genéticos con ambientales, sino de los primeros entre sí. Al observar que existe interacción digénica que nos permite predecir en cierta medida si una mujer está en riesgo de padecer FOP, podemos avanzar un poco más y aventurar si la interacción entre alelos de más de dos genes candidatos (un análisis multilocus) puede precisarnos aún más la posible predisposición a padecer ésta y otras enfermedades.

En consecuencia, la investigación genética representa ahora una de las más activas áreas dentro de la Endocrinología Ginecológica. Aún cuando nos

hallamos en fases preliminares, esperamos que entre de lleno en nuestra práctica clínica. Detallar el mapa genético, y los polimorfismos o mutaciones que influyen sobre la ventana reproductiva permitirá en un futuro conocer mejor su fisiopatogenia e identificar a individuos con alto riesgo de sufrir FOP, para así desarrollar programas de prevención individualizados y habilitar la *Medicina Predictiva*. También facultará la posibilidad de anticipar respuestas o resistencias a los tratamientos convencionales y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas (Medicina Personalizada). Es pues una carrera por etapas en la que dejamos atrás aquella en la que se pensaba que todo podría resultar fácil con la determinación de un solo *locus*. Nos adentramos en la siguiente fase, donde impera conocer qué interacciones génicas existen, cuáles son sus relaciones con los factores ambientales y cómo explican la fisiopatogenia de la ventana reproductiva.

RIASSUNTO

Come si può comprendere, esistono importanti ragioni sociali, culturali e mediche che ci incitano ad approfondire lo studio dei fattori o variabili suscettibili di modificare la durata del periodo fertile della vita di una donna. Dall'analisi della letteratura che abbiamo appena rivisto emergono varie impressioni: in primo luogo che ciò che abbiamo chiamato "periodo fertile", tempo tra l'età del menarca e l'età della menopausa, viene segnato antropologicamente, e solo le condizioni sociali o di salute negative possono modificarlo. In effetti, nei paesi sviluppati abbiamo potuto comprovare che l'età della menopausa rimane stabile da molti decenni; e che l'età del menarca ha continuato a discendere dalla seconda metà del secolo scorso col miglioramento delle condizioni sociali, rimanendo stabile negli ultimi anni.

Quando il ritardo o anticipo di queste due pietre miliari è tanto elevato da considerarsi come "patologico", può condizionare non solo la fertilità della donna ma anche ripercuotersi su altre sfere della sua salute.

Questo si osserva chiaramente nelle donne con menopausa precoce, più suscettibili di soffrire i segni e sintomi del ipoestrogenismo e di soffrire a mezzo o a lungo termine uno dei suoi processi invalidanti, come l'osteoporosi.

Infine, entrambi i fenomeni, menopausa e menarca, presentano un chiaro vincolo con l'endocrinologia dell'asse ipotalamo-ipofisario-gonadale. Se la ricerca in genetica sta modificando la nostra concezione della Medicina in generale, questo è ancora molto più evidente nella Ginecologia Endocrina.

In altre parole, è opportuno investigare se le alterazioni nel genotipo di una donna possono condizionare il momento di apparizione del menarca e della menopausa e, in conseguenza, avere influenza sulla sua capacità riproduttiva o predisporla o proteggerla da determinate malattie.

In conseguenza, nel nostro lavoro ci siamo prefissi i seguenti Obiettivi:

PRINCIPALI

1. Valutare la relazione tra la presenza di polimorfismi genetici associati agli estrogeni con la durata del periodo fertile nella nostra popolazione, in concreto osservare se esistono polimorfismi genetici che predispongano ad una minore età del menarca o della menopausa.

2. Determinare se i polimorfismi descritti nella letteratura e relazionati con la menopausa precoce sono presenti nelle nostre pazienti con menopausa precoce.
3. Determinare se la relazione tra la presenza di polimorfismi genetici associati agli effetti metabolici degli estrogeni con la durata del periodo fertile è monogenica o se esistono interazioni tra geni.

SECONDARI

4. Segnalare se i fattori di rischio conosciuti di menopausa precoce o menarca tardiva si presentano nelle nostre pazienti.
5. Segnalare se esistono altri fattori di rischio igienico-dietetici o caratteristiche medico-sociali relazionate col periodo fertile che non siano stati notificati in altri studi epidemiologici.
6. Segnalare se nella nostra popolazione si osserva la stessa tendenza alla diminuzione dell'età del menarca e alla stabilizzazione dell'età della menopausa registrata nei altri paesi europei.

La popolazione di studio corrisponde a 1980 donne in menopausa inserite in uno studio multicentrico sui fattori genetici che influiscono sulla presentazione del menarca e della menopausa, in cui hanno partecipato cinque centri spagnoli. Tutte le pazienti hanno ricevuto informazione dettagliata sull'obiettivo dello studio, e hanno dato il loro consenso scritto per parteciparvi. Questo progetto ha ricevuto l'approvazione dei comitati etici di ogni ospedale incluso nello studio.

Di tutte le partecipanti si è ottenuta una informazione epidemiologica specifica, il dato dell'età di menarca e/o menopausa e sangue periferico per analisi genetica. Si sono escluse donne in premenopausa e con menopausa artificiale (iatrogena) chirurgica, o pazienti che non compilarono il questionario nella sua totalità o la cui informazione genetica non fosse ottenuta per qualunque causa. Per semplificare l'esame statistico abbiamo inoltre escluso il gruppo di pazienti con menopausa tra i 40 ed i 45 anni, considerando unicamente quelle che presentarono menopausa precoce con meno di 40 anni e quelle che ebbero l'ultima mestruazione al di sopra dei 45 anni.

Il processamento dei dati si realizzò col programma statistico SSPS 15.0.

In totale si valutarono undici polimorfismi dei 6 geni candidati.

Nell'aprile del 2003 si pubblicò la sequenza completa del genoma umano. Questo progetto culmina un sforzo internazionale per determinare il genoma umano completo, definito come la somma totale dell'informazione genetica della nostra specie contenuta in ogni cellula nucleata del corpo; ed inizia una fase molto più interessante di applicazione per la diagnosi e la comprensione delle malattie. Gli studi di associazione genetica inglobano un gruppo di tecniche progettate per isolare geni e mutazioni geniche incluse in status biologici semplici (monogenici) e complessi, multigenici o poligenici, come possono essere malattie, quadri clinici sindromici o effetti avversi e reazioni a farmaci. La delucidazione dei geni che si implicano in ogni situazione biologica o status biologico permette di ottenere piste sulla patogenesi, o almeno spiegazioni parziali circa i meccanismi e il corso delle malattie o altri status biologici.

L'idea basilare soggiacente a tutti gli studi di associazione genetica è che tanto le caratteristiche fenotipiche normali come le malattie sono dovute ad un'interazione o combinazione di fattori ambientali che operano su un fondo genetico individuale.

Esistono due modi fondamentali di abordare gli studi di associazione genetica. Uno di essi mette a fuoco lo studio di uno o vari geni candidati. I geni candidati sono loci selezionati in anticipo, prima di realizzare lo studio, sulla base di un'ipotesi di lavoro. Questa ipotesi dipende dalla situazione e conoscenza delle basi molecolari del tratto o malattia in studio. Esempio di abordaggio di geni candidati sono quegli inclusi nella sintesi di enzimi, differenti recettori, trasportatori, fattori di crescita, o altre biomolecole che sono stati ascritte ad una determinata rotta biochimica che si sospetta essere relazionata nell'eziologia di una determinata malattia.

L'altra strategia fondamentale usata nello studio di associazione genetica è l'identificazione di geni usando l'indagine completa del genoma ("shot gun approach"), studi di associazione del genoma completo, eccetera.

Uno dei suoi mezzi più usati recentemente è l'uso dei polimorfismi di un gene determinato, intesi come le variazioni della sequenza di DNA di questo gene. La questione che è qui sottoposta è se il periodo fertile di una donna viene determinato geneticamente, per analizzare se ha interesse la determinazione

dei polimorfismi dei geni candidati o relazionati coi meccanismi che riguardano il periodo riproduttivo. Lo abbiamo definito come il periodo teoricamente fertile di una donna, e che concettualmente potremmo delimitare tra l'età del menarca e quella della menopausa, benché nella pratica sappiamo che la fertilità tarda ad essere certa dopo la prima mestruazione e declina a livelli esigui anni prima della menopausa.

In questo senso, sembra universalmente accettato che la dotazione ovocitaria di una donna venga determinata geneticamente da quando si forma nelle prime settimane del suo sviluppo embrionale. Ci sono ragioni per pensare che tanto il momento nel quale incomincia la dominanza follicolare, la pubertà, e, in conseguenza, la possibilità di essere fertile, come il ritmo del reclutamento follicolare, vengono determinati geneticamente. Queste accezioni offrono alcune possibilità alle influenze dell'ambiente, "l'ambioma", nella configurazione temporanea del periodo riproduttivo, come si è analizzato nell'introduzione e nella discussione di questa tesi.

Abbiamo stabilito dunque che il periodo di fertilità di una donna rimane più o meno circoscritto al tempo che trascorre tra il suo menarca e la sua menopausa e che viene fortemente condizionato dal suo genoma.

Perché allora un studio genetico sulle differenze del periodo fertile della popolazione? Da un lato, la conoscenza che determinate mutazioni o polimorfismi genetici possano anticipare le età del menarca o la menopausa può metterci all'erta verso i possibili rischi che implicano varie patologie: disordini metabolici o maggiore rischio di tumore al seno delle donne che hanno avuto una pubertà precoce; osteoporosi, patologie cardiovascolari e processi neurodegenerativi nelle donne con menopausa precoce.

In effetti, benché accettiamo che situazioni "ambientali" come le abitudini dietetiche o certe malattie possono essere fattori molto relazionati con la Insufficienza Ovarica Precoce, per comprendere la singolarità di questo processo è altrettanto preziosa l'esplorazione del suo genoma.

D'altra parte, e benché non sia alla portata di questo lavoro, è probabile che un'alterazione genetica che anticipi l'età della menopausa, anticipi anche il momento di deplezione follicolare a partire dal quale la fertilità sia significativamente diminuita e in conseguenza che il periodo fertile si riduca.

È il nostro principale proposito per il futuro sulle ripercussioni della Genetica Clinica in Riproduzione Umana, la possibilità di predire quale sarà il periodo fertile di una donna. In pochi anni di ricerca genetica con microarrays di DNA sono stati molti i lavori pubblicati sull'associazione di polimorfismi genetici con determinate malattie ginecologiche. Nel 2002, il nostro gruppo espose l'ipotesi che esistono geni relazionati con la produzione di estradiolo e in conseguenza, con molte malattie relazionate con gli estrogeni, ed iniziò la raccolta di dati nel 2004 fino a reclutare più di due mille donne postmenopausiche disposte a partecipare ad uno studio come volontarie. In esse, pensiamo che la genotipazione di questi geni candidati permetterebbe di dare risposta a domande concrete come, ad esempio: “ Esiste un profilo genetico di alta produzione endogena di estrogeni?”, “Esiste un profilo genetico di ipersensibilità all'effetto dell'estrogeno?”, “Esiste un profilo genetico inverso all'anteriore?”, “Quanti elementi compongono ogni profilo?”, “Come si accordano tra sé?”, “Come si accordano coi fattori di rischio classici?” e “Che percorsi molecolari seguono?”

Da allora abbiamo osservato che determinati polimorfismi relazionati con gli estrogeni si associano con malattie o processi ginecologici come l'osteoporosi postmenopausica, la sindrome di iperestimolazione ovarica, l'anovulazione o la sterilità. I risultati ottenuti in ognuno degli studi realizzati hanno confermato la validità della nostra serie per realizzare l'analisi di geni candidati associati ai differenti fenotipi relazionati col metabolismo degli estrogeni; ed i risultati epidemiologici ottenuti appoggiano fermamente questa associazione.

Il presente studio pretende di approfondire la conoscenza delle varianti dei geni relazionati con la durata del periodo riproduttivo, per cercare di assimilarli ai fattori di rischio associati con l'Insufficienza Ovarica Precoce o la diminuzione della fertilità. Inoltre, la descrizione dettagliata del gruppo di donne che parteciparono allo studio, ci permette di conoscere la distribuzione nel nostro ambiente dei fattori di rischio conosciuti di Insufficienza Ovarica Precoce, come ad esempio abitudini tossiche, malattie concomitanti, trattamenti ricevuti, e descrivere l'esistenza di altri parametri scatenanti o protettivi fino ad ora non studiati.

Esistono alcune difficoltà inerenti al carattere multicentrico del lavoro che limitano il potere dello studio, come la variabilità della popolazione selezionata,

e pertanto delle sue abitudini igienico-dietetiche, più le differenze che derivano dalle determinazioni analitiche. Per ciò, abbiamo cercato di minimizzarli mediante l'elaborazione di un questionario dettagliato, facile da compilare e comune ai cinque centri, centralizzando l'analisi genetica in un unico laboratorio situato a Siviglia. L'elevato numero di partecipanti, al contrario, conferisce a questo studio una notevole possibilità di estrapolare conclusioni.

D'altra parte, l'errore dovuto alla memoria delle donne non può essere tanto importante, poiché l'apparizione della prima e dell'ultima mestruazione sono avvenimenti molto importanti nella vita di una donna che rimangono registrati in qualunque storia ginecologica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La edad de la menarquia en nuestra población ha seguido una tendencia a adelantarse desde la segunda mitad del siglo pasado, con valores semejantes a los observados en otros países de nuestro entorno europeo, sobre todo en Francia e Italia.
2. El adelantamiento en la menarquia se corresponde con un aumento paralelo de la talla de nuestras mujeres, en concordancia también con lo observado en otros países de nuestro entorno y explicable, como en ellos, a la mejora de las condiciones sociosanitarias.
3. Como era de esperar, y en concordancia con los estudios epidemiológicos, la edad de la menopausia ha permanecido estable durante las mismas décadas en que se valoró la edad de la menarquia. En consecuencia, la ventana fértil de esta población ha aumentado en estos años secundaria a un adelanto en la edad de la menarquia.
4. De los factores epidemiológicos analizados con la edad de menarquia y de la menopausia, ninguno de ellos se ha asociado a una disminución de la edad de la menopausia.
5. En contra de lo publicado en otras series, las mujeres con menarquia temprana no han presentado más riesgo de cáncer de mama, aunque sí muestran un mayor porcentaje en alguno de los rasgos que definen al síndrome metabólico, especialmente la obesidad.
6. El análisis unilocus de los 11 polimorfismos genéticos estudiados en los genes candidatos ESR1, ESR2, FSHR, CYP19A, NRIP1 Y BMP15 nos muestra una gran heterogenicidad. La presencia de todos ellos en los grupos poblacionales comparados (menarquia precoz, menarquia normal, FOP y menopausia normal) descarta que uno de ellos por si mismo determine el tiempo de duración de la ventana fértil.
7. Nuestros resultados confirman la importancia del gen BMP15 en la disminución de la edad de menopausia, aunque esto debe ser visto con precaución.
8. Nuestros resultados sugieren que la variante A180T del gen *BMP15* es un alelo de muy baja frecuencia en la población española, donde no es suficiente ni necesario para generar un FOP.

9. En el análisis digénico, observamos una relación entre la duración de la ventana fértil y la interacción de varias variantes alélicas de los genes candidatos analizados, fundamentalmente entre ESR2, FSHR y NRIP1. Esto nos advierte de la naturaleza compleja de estos parámetros y de la necesidad de enfocar el diagnóstico genético hacia la interacción de los distintos genes entre sí y de estos con los factores ambientales.

CONCLUSIONI

1. Nella popolazione oggetto di questa tesi, si è osservata un'anticipazione dell'età del menarca a partire dalla seconda metà del secolo passato, registrandosi valori simili agli osservati in altri paesi europei, soprattutto Francia e Italia.
2. L'anticipazione del menarca coincide con un aumento parallelo dell'altezza delle donne da noi studiate, in concordanza anche con ciò che si è osservato con altri paesi vicini a noi e spiegabile con il miglioramento delle condizioni socio sanitarie.
3. Come era previsibile e concordando con gli studi epidemiologici, l'età della menopausa è rimasta stabile durante gli stessi decenni in cui si è valorata l'età del menarca. Di conseguenza, il periodo fertile di questa popolazione è aumentato in questi anni, secondariamente a una anticipazione dell'età del menarca.
4. Nessuna delle caratteristiche epidemiologiche relazionate con l'età del menarca e della menopausa si è associata a una diminuzione dell'età della menopausa.
5. A differenza di quanto si è pubblicato in altri studi, le donne che hanno avuto un menarca precoce, non hanno presentato più rischio di carcinoma mamario, hanno presentato invece una maggiore percentuale di alcuni tratti che definiscono la sindrome metabolica, soprattutto la obesità.
6. L'analisi unilocus degli 11 polimorfismi genetici studiati dei geni considerati ESR1, ESR2, FSHR, CYP19A, NRIP1 Y BMP15 ci mostra una grande eterogenità. La presenza di tutti questi polimorfismi nei gruppi confrontati (menarchia precoce, FOP e menopausa normale), esclude che uno di loro preso in considerazione da solo possa determinare la durata del periodo fertile.
7. I nostri risultati confermano l'importanza del gene BMP 15 nella diminuzione dell'età della menopausa, anche se questo dato va considerato con precauzione.

8. I nostri risultati suggeriscono che la variante A180T del gene *BMP15* è un allele molto poco frequente nella popolazione spagnola, dove non è necessario né sufficiente per generare un FOP.
9. Nell'analisi digenico, osserviamo una relazione tra l'età del menarca e la interazione di varie variante alleliche, fondamentalmente dei geni *ESR2*, *FSHR* e *NRIP1*. Questo ci avverte della natura complessa di questi parametri e della necessità di infocare la diagnosi genetica verso la interazione dei distinti geni tra loro, e di questi con i fattori ambientali.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Murram D, Dewhurst J, Grant DB, Premature menarche: a follow up study, Arch Dis Child 1983; 58:142.
- ² Argente J. Diagnostic of late puberty. Horm Res 1999; 51(3):95-100.
- ³ Millar W, Styne D. Female puberty and its disorders. In: Yen S, Jaffe R, Barbieri R, editors. Reproductive endocrinology. Physiology, pathophysiology, and clinical management. Philadelphia: WB Saunders Co; 1999; 388-412.
- ⁴ Schmidt P, et al. Basal and stimulated gonadotropin levels in the perimenopause. Endocrine Reviews 1998; 19:397-428.
- ⁵ Utian WH. The International Menopause Society menopause-related terminology definitions. Climacteric 1999; 2:284-6.
- ⁶ Van Keep RA. Consenso sobre investigación de la Menopausia. Actas del Primer Congreso Internacional sobre Menopausia. La Grande Motte. Francia 1976.
- ⁷ Whitehead MS. Atlas de Menopausia. Barcelona. Harofarma. Ltd 1994.
- ⁸ Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. The Menopause. Lancet 1999;353:571-580.
- ⁹ Mitchell ES, Woods NF, Mariella A, Three stages of the menopausal transition from the Seattle Midlife Women's Health Study: toward a more precise definition. Menopause 2000; 7(5):334-49.
- ¹⁰ Calaf J Pubertad y Menopausia normal y patológica. En: Vanrell JA, Calaf J, Balash J, Viscasillas P. Fertilidad y esterilidad humanas. Masson – Salvat Editores. Barcelona 1992; 79-96.
- ¹¹ Instituto Nacional de Estadística. Boletín Mensual de Estadística. INE 2005. <http://www.ine.es/inebase>
- ¹² Instituto Nacional de Estadística. Esperanza de vida al nacimiento por país-año/periodo sexo. INE 2000. <http://www.ine.es/inebase/cgi>.
- ¹³ Grumbach MM, Kaplan SL, Recent advances in the diagnosis and management of sexual precocity, Acta Paediatr Jpn 1988; 30:115-75.
- ¹⁴ Kaplan SL, Grumbach MM, Pathophysiology and treatment of sexual precocity, J Clin Endocrinol Metab 1990; 71(4):785-9.
- ¹⁵ Boyar RM, Rosenfeld RS, Finkelstein JW, Roffwarg HP, Weitzman ED, Hellman L, N Engl J Med. 1974; 54 (3):609-18.

-
- ¹⁶ Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken JR, Rimpela M, Rose JR, Common genetic influences on BMI and age at menarche, *Hum Biol* 1995; 67:739.
- ¹⁷ Stavrou I, Zois C, Ioannidis JPA, Tsatsoulis A, Association of polymorphism of the estrogen receptor α gene with the age of menarche, *Hum Reprod* 2002;17: 1101.
- ¹⁸ Gorai I., Tanaka K., Inada M., Morinaga H., Uchiyama Y., Kikuchi R., Chaki O., Hirahara F. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor-alpha polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:799-803.
- ¹⁹ Speroff L, Fritz MA, Anomalías de la pubertad y problemas del crecimiento. En: *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad*. 2ª edición en castellano; 2006; 366.
- ²⁰ Tanner JM, *Growth at adolescence*, 2nd ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1962.
- ²¹ Zacharias L, Wurtman RJ, Blindness: its relation to age of menarche, *Science* 1964; 144:1154.
- ²² Zacharias L, Wurtman RJ, Blindness and menarche, *Obst Gynecol* 1969; 33:603-608.
- ²³ Marti-Henneberg C, Vizmanos B, The duration of puberty in girls is related to the timing of its onset, *J Pediatr* 1997; 131:618.
- ²⁴ Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Fawe L, Franchimont P, Effect of changes in nutritional conditions on timing of puberty: clinical evidence from adapted children and experimental studies in the male rat, *Hum Res* 1992;38(1):97-105.
- ²⁵ Silver HK. Asymmetry, short stature, and variations in sexual development. *Am J Dis Child* 1964;107: 495-515
- ²⁶ Lazar L., Pollack U., Kalter-Leibovici O., Pertzalan A., Phillip M. Persistently short children with IUGR have a distinct pubertal growth pattern, *Horm Res* 2002; 58(2):85.
- ²⁷ Frisch RE., Revelle R., Cook S. Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: estimated total water, lean body weight and fat. *Hum Biol* 1973; 45:469-483.
- ²⁸ Frisch RE, Revelle R, Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight-for-weight for their maintenance or onset, *Science* 1974; 185:949.

- ²⁹ Anderson SE., Dallal GE., Must A. Relative weight and race influence average age at menarche: results from two national representative surveys of US girls studied 25 years apart. *Pediatrics* 2003; 111:844-850.
- ³⁰ Wattigney WA., Srinivasan SR., Chen W., Greenlund KJ., Berenson GS. Secular trend of earlier onset of menarche with increasing obesity in black and white girls: the Bogalusa Heart study. *Ethn Dis* 1999; 9: 181-189.
- ³¹ Maclure M, Travis LB, Willet W, MacMahon B, A prospective cohort study of nutrient intake and age of menarche, *Am J Clin Nutr* 1991; 54:649.
- ³² Adair LS, Gordon-Larsen P, Maturational timing and overweight prevalence in US adolescent girls, *Am J Public Health* 2001;91:642.
- ³³ Monckeberg F. *Desnutricion Infantil*. Impresora Creces Ltda., Santiago, Chila. 1988.
- ³⁴ Susking RM. *Malnutrition and the immune response*. Raven Press, New York, USA 1985.
- ³⁵ Santiago Muzzo B, Influence of environmental factors in the timing of puberty, *Rev Chil Nutr* 2007;34(2):96-104.
- ³⁶ Proos LA., Anthropometry in adolescence-secular trends, adoption, ethnic and environmental differences. *Horm Res* 1993;39(3):18-24.
- ³⁷ Legro RS, Lin HM, Demers LM, Lloyd T, Rapid maturation of the reproductive axis during perimenarche independent of body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1021.
- ³⁸ De Ridder CM, Thijssen JHH, Bruning PF, Van den Brande JL, Zonderland ML, Erich WBM, Body fat mass, body fat distribution, and pubertal development: a longitudinal study of physical and hormonal sexual maturation of girls, *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:442.
- ³⁹ Garcia- Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguex C, Casanueva FF, Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage, *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2849.
- ⁴⁰ Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, Leptin is inversely related to age at menarche in human females, *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1966.
- ⁴¹ Palmert MR, Radovick S, Boepple PA, Leptin levels in children with central precocious puberty, *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2260.

- ⁴² Hassink SG, Sheslow DV, De Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development, *Pediatrics* 1996; 98:201.
- ⁴³ Quinton ND, Smith RF, Clayton PE et al. Leptin binding activity changes with age: The link between leptin and puberty, *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2336-2341.
- ⁴⁴ Howdeshell KL., Hotchkiss AK., Thayer KA., Vanderbergh JG., Von Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999; 401: 763-764.
- ⁴⁵ Eveleth PB, Tanner JM. *Worldwide variation in human growth*, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1990.
- ⁴⁶ Parent SA., Teilmann G., Juul A., Skakkebaek NE., Toppari J., Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends and changes after migration. *Endoc Rev* 2003;24:668-693.
- ⁴⁷ Sultan C., Paris F., Jeandel C., Attal G., Lumbroso S., Dumas R. L'âge de la puberté et de la menarché. *Rev Int Pediat* 2001; 32:9-10.
- ⁴⁸ Marrodan MD., Mesa MS., Arechiga J., Perez-Magdaleno A. Trend in menarcheal age in Spain: rural and urban comparison during a recent period. *Ann Hum Biol* 2000; 27:313-319.
- ⁴⁹ Mul D., Fredriks A.M., van Buuren S., Oostdijk W., Verloove-Vanhorick S.P., Wit J.M. Pubertal development in the Netherlands 1965-1997. *Pediatr Res* 2001; 50:479-486.
- ⁵⁰ Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE and dieldrin. *Environ Health Perspect* 2001;19(supl 1):35-47.
- ⁵¹ Van Wiergen J.C. Secular growth changes. In: *Human growth: a comprehensive treatise*. Eds: Falkner F. Tanner J.M. Plenum Press. 1986;3:307-331.
- ⁵² Cole T.J. Secular trends in growth. *Proc Nutr Soc* 2000;59:317-324.
- ⁵³ Floud R., Wachter K., Gregory A. *Height, health and history*. Cambridge University Press, Cambridge. 1990.
- ⁵⁴ Komlos J. Stature and nutrition in the Habsburg monarchy: the standard of living and economic development. *Am Historical Rev* 1985;90:1149-1161.
- ⁵⁵ Schmidt L.M., Jorgensen M.H., Michalsen K.F. Height of conscript in Europe: is post-neonatal mortality a predictor. *Ann Hum Biol* 1995;22:57-67.

-
- ⁵⁶ Kuczmarki R.G., Ogden C.L. Grummer-Strawn L.M., Flegal K.M., Guo S.S., Wei R., Curtin L.R., Roche A.F., Johnson C.L. CDC growth charts: United States. National Centre for Health Statistics. Hyattsville, MD, USA. 2000.
- ⁵⁷ Takaishi M. Secular changes in growth of Japanese children. *J Pediatr Endocrinol* 1994;7:163-173
- ⁵⁸ Tanner J.M., Hayashi T., Preece M.A., Cameron N. Increase in length of leg relative to trunk in Japanese children and adults from 1957 to 1977: comparison with British and with Japanese Americans. *Ann Hum Biol* 1982;9:411-423.
- ⁵⁹ Morón Civanto F.J. Análisis de factores genéticos en enfermedades relacionadas con los estrógenos. (tesis doctoral). Editorial de la Universidad de Sevilla; 2008.
- ⁶⁰ Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW, Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid levels in the rat. *J Clin Invest.* 1987;80:294-9.
- ⁶¹ Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert TM, The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function, *Recent Prog Horm Res* 1976; 32:161.
- ⁶² Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL, Reiter EO, Correlation of LHRF induced LH and FSH release from infancy to 19 years with the changing pattern of gonadotropin secretion in agonadal patients: relation to restraint of puberty, *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50:165.
- ⁶³ Plant TM, Puberty in primates. En Knobil E, Neill JD, eds *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1988; 2: 1763-1778.
- ⁶⁴ Roth JC, Kelch RP, Kaplan SL, Grumbach MM, FSH and LH response to luteinizing hormone-releasing factor in prepubertal children, adult males and patients with hypogonadotropic and hypergonadotropic hypogonadism, *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 37:680.
- ⁶⁵ Sizonenko PC, Paunier L, Carmignac D, Hormonal changes during puberty: IV. Longitudinal study of adrenal androgen secretion, *Horm Res* 1976; 7:288.
- ⁶⁶ Hauffa BP, Kaplan SL, Grumbach MM, Dissociation between plasma adrenal androgens and cortisol in Cushing's disease and ectopic CTH producing tumor: relation to adrenarche, *Lancet* 1984;1373.
- ⁶⁷ Cavallo A, Melatonin secretion during adrenarche in normal human puberty and in pubertal disorders, *J Pineal Res* 1992; 12:71.

- ⁶⁸ Terasawa E, Noonan JJ, Nass TE, Loose MD, Posterior hypothalamic lesions advance the onset of puberty in the female rhesus monkey, *Endocrinology* 1984;115:224.
- ⁶⁹ Foster DL, Ryan KD, Endocrine mechanism governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of LH in the lamb during puberty, *Endocrinology* 1979;105:896.
- ⁷⁰ Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E, Gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:396.
- ⁷¹ El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM, Neuropeptide Y: a hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6179.
- ⁷² Waldhauser F, Boepple PA, The pubertal growth spurt in eight patients with true precocious puberty and growth hormone deficiency: evidence for a direct role of sex steroids, *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:975.
- ⁷³ Lemarchand-Béraud T, Zufferey MM, Reymond M, Rey I. Maturation of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982 Feb; 54(2):241-6.
- ⁷⁴ Apter D, Butzow TL, Laughlin GA, Yen SSC, Gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins, *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:940.
- ⁷⁵ Mansfield MJ, Rudlin CR, Criegler Jr JF, Karol KA, Crawford JD, Boepple PA, Crowley Jr WF, Changes in growth and serum growth hormone and plasma somatomedin-C levels during suppression of gonadal sex steroid secretion in girls with central precocious puberty, *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:3.
- ⁷⁶ Biro FM, Lucky AW, Simbartl LA, Barton BA, Daniels SR, Striegel-Moore R, Kronsberg SS, Morrison JA, Pubertal maturation in girls and the relationship to anthropometric changes: pathways through puberty, *J Pediaatr* 2003, 142:643.
- ⁷⁷ Vuorento T, Huhtaniemi I, Daily levels of salivary progesterone during menstrual cycle in adolescent girls, *Fertil Steril* 1992, 58:685.
- ⁷⁸ Speroff L, Fritz MA, Anomalías de la pubertad y problemas del crecimiento. En: *Endocrinología ginecológica clínica y esterilidad*. 2ª edición en castellano; 2006; 365.
- ⁷⁹ Pescovitz OH, Hench KD, Barnes KM, Loriaux DL, Cutler GB Jr. Premature thelarche and central precocious puberty: the relationship between clinical

presentation and the gonadotropin response to luteinizing hormone-releasing hormona. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Sep;67(3):474-9.

⁸⁰ Utian WH: Overview on menopause *Am J Obstet Gynecol.* 1987, 156: 1280-1283.

⁸¹ Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957, 11:398-411.

⁸² Goadall J. *The chimpancés of Gombe: Patterns of Behavior.* Cambridge: Harvard University Press, 1986.

⁸³ Woodburn J. An introduction to Hadza ecology. In Lee R, DeVore I, eds *Man the Hunter.* Chicago: Aldine 1968.

⁸⁴ Hawkes K, O'Connell JF, Blurton Jones NG, et al. Grandmothering, menopause, and the evolution of human life histories. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:1336-9.

⁸⁵ McDevitt TM, Report WP/98, *World Population Profile: 1998,* US. Bureau of the Census, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1999.

⁸⁶ Midgette A, Baron JA, Cigarette smoking and the risk of natural menopause, *Epidemiology* 1990; 1:474.

⁸⁷ Torgerson DJ, Avenell A, Russell IT, Reid DM, Factors associated with onset of menopause in women aged 45-49, *Maturitas* 1994; 19:83.

⁸⁸ Baird DD, Tylavsky FA, Anderson JJB, Do vegetarians have earlier menopause?, *Am J Epidemiol : Proceedings of the Society of Epidemiologic Research:* 1988; 907.

⁸⁹ Ginsburg EL, Mello NK, Mendelson JH, Barbieri RL, Teoh SK, Rothman M, Gao X, Sholar JW, Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women, *JAMA* 1996; 276:1747.

⁹⁰ Torgerson DJ, Thomas RE, Campbell MK, Reid DM, Alcohol consumption and age of maternal menopause are associated with menopause onset, *Maturitas* 1997; 26:21.

⁹¹ De Moraes-Ruehsen M, Jones GS. Premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 1967; 18(4): 440-61.

⁹² Rebar RW. Premature ovarian failure. En : *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects.* Lobo RA, ed. New York: Raven Press, Ltd; 1994: 25-34.

- ⁹³ Van Kasteren YM, Hundscheid RD, Smits AP, Cremers FP, Van Zonneveld P, Braat DD. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod* 1999; 14(10):2455-9.
- ⁹⁴ 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; 18:199.
- ⁹⁵ Den Tonkelaar I, TE Velde ER, Looman CW. Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. *Maturitas* 1998; 29: 115-123.
- ⁹⁶ National Institute on Aging U.S. Department of Health and Human Service Public Health Service. National Institutes of Health July 2006.
- ⁹⁷ Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Brett SE, Ritter JM, Sex differences in endothelial function in normal and hypercholesterolaemic subjects, *Lancet* 1994;344:305.
- ⁹⁸ Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F, Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure- activity relationship, *Mol Pharm* 1997; 51:535.
- ⁹⁹ Wooley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA, Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density, *J Neurosci* 1997; 17:1848.
- ¹⁰⁰ Anasti JN. Premature ovarian failure: An update. *Fertil Steril*.1998; 70:1-15.
- ¹⁰¹ Nelson LM, Anasti JN, Flack MR. Premature ovarian failure. In: Hadáís EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive endocrinology, surgery, and technology*. 1st ed. New Cork: Lippincott-Raven; 1995:1393-410.
- ¹⁰² Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM, et al. Molecular and cytogenetic studies of fan X; autosome traslocation in a patient with premature ovarian failre and review of the literatura. *Am J Med Genet* 1994; 52:19-26.
- ¹⁰³ Sherman SL, Premature ovarian failure in the fragile X síndrome. *Am J Med Genet* 2000 Fall; 97(3):189-94.
- ¹⁰⁴ Levy HL, Driscoll SG, Porenski RS, Wender DF, Ovarian failure in galactosemia. *New Engl J Med* 1984; 310:50.
- ¹⁰⁵ Robinson ACR, Dockeray CG, Cullen MJ, Sweeney EC, Hypergonadotrophic hypogonadism in classical galactosemia:evidence for defective oogenesis: case report, *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:199.

- ¹⁰⁶ Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A, Berry GT, Steiner RD, Elsas LJ, Rosk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia, *J Pediatr* 2000; 137:833.
- ¹⁰⁷ Larsen EC, Muller J, Rechnitzer C, Shmiegelow K, Andersen AN. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH < 10 IU/l. *Hum Reprod.* 2003;18:417-22.
- ¹⁰⁸ Wallace WH, Hendry JH, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol.* 1989; 62(743):995-8.
- ¹⁸ Midgette AS, Baron JA. Cigarette smoking and the risk of natural menopause. *Epidemiology.* 1990; 1:474-80.
- ¹¹⁰ Bromberger JT, Matthews KA, Kuller LH, Wing RR, Enhillan EN, Paje P. Prospective study of the determinants of age at menopause. *Am J Epidemiol.* 1997; 145:124-33.
- ¹¹¹ Cooper GS, Baird DD, Hulka BS, Weinberg CR, Svitz DA, Hughes CL. Follicle-stimulating hormone concentrations in relation to active and passive smoking. *Obstet Gynecol.* 1995;85:407-11.
- ¹¹² Windham GC, Elkin EP, Swan SH, Waller KO, Fenster L. Cigarette smoking and effects on menstrual function. *Obstet Gynecol.* 1995;85:407-11.
- ¹¹³ Cramer DW, Barbieri RL, Fraer AR, Harlow BL. Determinants of early follicular phase gonadotrophin and estradiol concentrations in women of late reproductive age. *Hum Reprod Update.* 2002; 17:221-7.
- ¹¹⁴ Bernard L, Kline J, Nelly A, Reuss ML, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod.* 2007; 22(4):1175-85.
- ¹¹⁵ Lucero J, Harlow BL, Barbieri RL, Sluss P, Daniel DW. Early follicular phase hormone levels in relation to patterns of alcohol, tobacco and coffee use. *Fertil Steril.* 2001; 76(4):723-9.
- ¹¹⁶ Hock A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997, 18:107-34.
- ¹¹⁷ Muir A, Schatz DA, MacLaren NK. Autoimmune polyglandular syndrome. In: de Groot LS, ed. *Endocrinology.* 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995; 3013-24.
- ¹¹⁸ Cramer D, Xu H, Harlow B. Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril* 1995; 65: 740-745.

- ¹¹⁹ Sneider H, Mc Gregor A, Spector T. Genes Control the Cessation of a Woman's Reproductive Life: A twin Study of Histerectomy and Age at Menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;83:1875-1880.
- ¹²⁰ Mallolas J, Duran M, Sanchez A, Jiménez D, Castllvi-Bel S, Rife M, Mila M. Implications of the FMR1 gene in menopause: study of 147 Spanish women. *Menopause* 2001; 8:106-110.
- ¹²¹ Albagha OM, Ralston SH. Genetics and osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2006 Nov;32(4):659-80.
- ¹²² Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA y Safe S. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem.* 2000;275:5379-87.
- ¹²³ Grumbach MM y Auchus RJ. Related Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:4677-94.
- ¹²⁴ Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;161:307-20.
- ¹²⁵ Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM y Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8:S14.
- ¹²⁶ Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H y Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet.* 1998;43:73-4.
- ¹²⁷ Sundarajan C, Liao WX, Roy AC y Ng SC. Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:135-9.
- ¹²⁸ Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, Lee J, Lui LY, Ziv E, Tice JA, Cummings SR y Rhee B. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106:273-80.
- ¹²⁹ Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, Peter I, Schmid CH y Karas RH, Mendelsohn ME, Housman DE, Levy D. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *JAMA.* 2003;290:2263-70.
- ¹³⁰ Aittomäki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehtväslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I y de la Chapelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell.* 1995;82:959-68.

- ¹³¹ Collins FS. Shattuck lecture--medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med.* 1999 Jul 1;341(1):28-37. Collins FS. Contemplating the end of the beginning. *Genome Res.* 2001 May;11(5):641-3. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature.* 2000 Jun 15;405(6788):857-65.
- ¹³² Morón FJ, Mendoza N, Quereda F, Vázquez F, Ramírez-Lorca R, Velasco J, Gallo JL, Salinas A, Martínez-Astorquiza T, Sánchez-Borrego R, Sáez ME, Ruiz A. Pyrosequencing technology for automated detection of the BMP15 A180T variant in Spanish postmenopausal women. *Clin Chem.* 2007 Jun;53(6):1162-4.
- ¹³³ Morón FJ, Mendoza N, Vázquez F, Molero E, Quereda F, Salinas A, Fontes, Martínez-Astorquiza T, Sánchez-Borrego R, Ruiz A. Multilocus analysis of estrogen-related genes in Spanish postmenopausal women suggests an interactive role of ESR1, ESR2 and NRIP1 genes in the pathogenesis of osteoporosis. *Bone.* 2006 Jul;39(1):213-21.
- ¹³⁴ Mendoza N, Morón FJ, Quereda F, Vázquez F, Rivero MC, Martínez-Astorquiza T, Real LM, Sánchez-Borrego R, González-Pérez A, Ruiz A. A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci.* 2008 Apr;15(3):305-11.
- ¹³⁵ Santalla Hernandez A.A. Importancia del gen Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP 15) y otros genes pertenecientes a la ruta estrogénica en la osteoporosis postmenopáusicas. (tesis doctoral). Editorial de la Universidad de Granada; 2008.
- ¹³⁶ Walker MD, Babbar R, Opotowsky A, McMahon DJ, Liu G, Bilezikian JP. Determinants of bone mineral density in Chinese-American women. *Osteoporos Int.* 2007; 471-8.
- ¹³⁷ Hadji P, Gottschalk M, Ziller V, Kalder M, Jackisch C, Wagner U. Bone mass and the risk of breast cancer: the influence of cumulative exposure to oestrogen and reproductive correlates. Results of the Marburg breast cancer and osteoporosis trial (MABOT). *Maturitas* 2007; 56:312-21.
- ¹³⁸ Kirchengast S, Gruber D, Sator M, Huber J. Impact of the age at menarche on adult body composition in healthy pre-and postmenopausal women. *Am J Phys Anthropol* 1998; 105:9-20.
- ¹³⁹ Laitinen J, Power C, Jarvelin MR. Family social class, maternal body mass index, childhood body mass index, and age at menarche as predictors of adult obesity. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:287-294.
- ¹⁴⁰ Adair LS, Gordon-Larsen P, Maturational timing and overweight prevalence in US adolescent girls. *Am J Public Health* 2001; 91: 642-644.

- ¹⁴¹ Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. Effects of obesity on growth and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19:374-390.
- ¹⁴² Emaus A, Espetvedt S, Veierød MB, Ballard-Barbash R, Furberg AS, Ellison PT, et al. 17- β -Estradiol in relation to age at menarche and adult obesity in premenopausal women. *Hum Reprod* 2008; 23(4): 919–927.
- ¹⁴³ Onland-Moret NC, Peeters PH, van Gils CH y col. Age at menarche in relation to adult height: the EPIC study. *Am J Epidemiol.* 2005;162(7):623-32.
- ¹⁴⁴ Soriano Guillén L, Blanco Rodríguez M, Cortés Martín M, Martínez Martín C. Secular trend of menarcheal age in Spanish adolescents. *Med Clin (Barc).* 2008;131(9):355-6.
- ¹⁴⁵ Harris MA, Prior JC, Koehoorn M. Age at menarche in the Canadian population: secular trends and relationship to adulthood BMI. *J Adolesc Health* 2008;43(6):548-54.
- ¹⁴⁶ Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham S, Khaw K, Wareham N, Ong KK. Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. *Diabetologia* 2008;51(5):781-6.
- ¹⁴⁷ Andersson SE, Must A. Interpreting the continued decline in the average age at menarche: results from two nationally representative surveys of US girls studied 10 years apart. *J Pediatr.* 2005;147:753-60
- ¹⁴⁸ Remsberg KE, Demerath EW, Schubert CM, Chumlea WC, Sun SS, Siervogel RM. Early menarche and the development of cardiovascular disease risk factors in adolescent girls: the Fels Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2718-24.
- ¹⁴⁹ Must A, Naumova EN, Phillips SM, Blum M, Dawsonhughes B, Rand WM. Childhood overweight and maturational timing in the development of adult overweight and fatness: the Newton Girls Study and its follow-up. *Pediatrics* 2005; 116: 620-7.
- ¹⁵⁰ Kindblom JM, Lorentzon M, Norjavaara E, Lonn L, Brandberg J, Angelhed JE et al. Pubertal timing is an independent predictor of central adiposity in young adult males: the Gothenburg osteoporosis and obesity determinants study. *Diabetes* 2006; 55: 3047-52.
- ¹⁵¹ Stice E, Presnell K, Bearman SK. Relation of early menarche to depression, eating disorders, substance abuse, and comorbid psychopathology among adolescent girls. *Dev Psychol* 2001; 37:608-19.
- ¹⁵² Steiner E, Klubert D, Knutson D. Assessing breast cancer risk in women. *Am Fam Physician* 2008;78(12):1361-6.

- ¹⁵³ Ferlay J, Bray F, Pisan P, Parkin DM, Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, IARC cancer base n° 5 version 20. Lyon: IARC Press 2005.
- ¹⁵⁴ Stavrou I, Zois C, Chatzikiyriakidou A, Georgiou I, Tsatsoulis A. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod.* 2006;21: 554-557.
- ¹⁵⁵ Pei YF, Zhang L, Deng HW, Dvornyk V. CYP17 MspA1 polymorphism and age at menarche: a meta-analysis. *Dis Markers* 2008;25(2):87-95.
- ¹⁵⁶ Kulik-Rechberger B, Skorupski P, Bogusiewicz M, Miotła P, Rechberger T. Polymorphism of CYP17 gene and age of menarche. *Ginekol Pol* 2007; 78(12):929-32.
- ¹⁵⁷ Long JR, Xu H, Zhao LJ, Liu PY, Shen H, Liu YJ, Xiong DH, Xiao P, Liu YZ, Dvornyk V, Li JL, Recker RR, Deng HW. The oestrogen receptor alpha gene is linked and/or associated with age of menarche in different ethnic groups. *J Med Genet* 2005;42(10):796-800.
- ¹⁵⁸ Stavrou I, Zois C, Chatzikiyriakidou A, Georgiou I, Tsatsoulis A. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod* 2006;21(2):554-7.
- ¹⁵⁹ Guo Y, Xiong DH, Yang TL, Guo YF, Recker RR, Deng HW. Polymorphisms of estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 may influence age at menarche: a genetic association study in Caucasian females. *Hum Mol Genet* 2006;15(16):2401-8.
- ¹⁶⁰ Rothenbuhler A, Fradin D, Heath S, Lefevre H, Bouvattier C, Lathrop M, Bougnères P. Weight-adjusted genome scan analysis for mapping quantitative trait Loci for menarchal age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3534-7.
- ¹⁶¹ Yang F, Xiong DH, Guo Y, Shen H, Xiao P, Zhang F, Jiang H, Recker RR, Deng HW. The chemokine (C-C-motif) receptor 3 (CCR3) gene is linked and associated with age at menarche in Caucasian females. *Hum Genet* 2007;121(1):35-42.
- ¹⁶² Zhao J, Xiong DH, Guo Y, Yang TL, Recker RR, Deng HW. Polymorphism in the insulin-like growth factor 1 gene is associated with age at menarche in caucasian females. *Hum Reprod* 2007;22(6):1789-94.
- ¹⁶³ Tsezou A, Tzetis M, Gennatas C, Giannatou E, Pampanos A, Malamis G, Kanavakis E, Kitsiou S. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta (ESR1, ESR2) and androgen receptor (AR) genes with the occurrence of breast cancer. *Breast* 2008;17(2):159-66.
- ¹⁶⁴ Mitchell ES, Farin FM, Stapleton PL, Tsai JM, Tao EY, Smith-DiJulio K, Woods NF. Association of estrogen-related polymorphisms with age at

menarche, age at final menstrual period, and stages of the menopausal transition. *Menopause* 2008;15(1):105-11.

¹⁶⁵ Gorai I, Tanaka K, Inada M, et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor-alpha gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:799-803.

¹⁶⁶ Weel AE, Uitterlinden AG, Westendorp IC, et al. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3146-3150.

¹⁶⁷ Boot AM, van der Sluis IM, de Muinck Keizer-Schrama SM, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density in healthy children and young adults. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 495-500.

¹⁶⁸ Long JR, Xu H, Zhao LJ, et al. The oestrogen receptor alpha gene is linked and/or associated with age of menarche in different ethnic groups. *J Med Genet.* 2005;42:796-800.

¹⁶⁹ Stavrou I, Zois C, Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Tsatsoulis A. Combined estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta genotypes influence the age of menarche. *Hum Reprod.* 2006;21: 554-557.

¹⁷⁰ Guo Y, Xiong DH, Yang TL, Guo YF, Recker RR, Deng HW. Polymorphisms of estrogen-biosynthesis genes CYP 17 and CYP19 may influence age at menarche: a genetic association study in Caucasian females. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2401-2408

¹⁷¹ Pei YF, Zhang L, Deng HW, Dvornyk V. CYP17 MspA1 polymorphism and age at menarche: a meta-analysis. *Dis Markers* 2008; 25:87-95.

¹⁷² Lai J, Vesprini D, Chu W, Jernström H, Narod SA. CYP gene polymorphisms and early menarche. *Mol Genet Metab* 2001; 74:449-57.

¹⁷³ Writing Group for the British Menopause Society Council. Management of premature menopause. *Menopause Int.* 2007 Mar;13(1):44-5.

¹⁷⁴ Murabito J. M., Yang Q., Fox C., Wilson P. W. and Cupples L. A. Heritability of age at natural menopause in the Framingham Heart Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005.;90:3427-3430.

¹⁷⁵ KHe Li-Na, Xiong D.-H., Liu Y.-J., Zhang F., Recker R. r. and Deng H.-W. 2007 Association study of the oestrogen signalling pathway genes in relation to age of natural menopause. *J Genet* 2007; 86: 269-276.

¹⁷⁶ Worda C., Walch K., Sator M., Eppel W., Tempfer C. B., Schneeberger C. et al. The influence of Nos3 polymorphisms on age at menarche and natural menopause. *Maturitas* 2004; 49:157-162.

- ¹⁷⁷ Weel A. E., Uitterlinden A. G., Westendorp I. C., Burger H., Schuit S. C., Hofman A. *et al.* Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1999; 84: 3146-3150.
- ¹⁷⁸ Long J. R., Shu X. O., Cai Q., Cai H., Gao Y. T., Jin F. and Zheng W. Polymorphisms of the *CYP1B1* gene may be associated with the onset of natural menopause in Chinese women. *Maturitas* 2006;55: 238-246.
- ¹⁷⁹ Kok H. S., van Asselt K. M., van der Schouw Y. T., Peeters P. H. and Wijmenga C. Genetic studies to identify genes underlying menopausal age. *Hum. Reprod. Update* 2005; 11:483-493.
- ¹⁸⁰ Hefler L. A., Grimm C., Heinze G., Schneeberger C., Mueller M. W., Muendlein A. *et al.* Estrogen-metabolizing gene polymorphisms and age at natural menopause in Caucasian women. *Hum. Reprod* 2005; 20:1422-1427.
- ¹⁸¹ Cramer D. W., Harlow B. L., Barbieri R. L. and Ng W. G. Galactose-1-phosphate uridyl transferase activity associated with age at menopause and reproductive history. *Fertil. Steril* 1989; 51:609-615.
- ¹⁸² Cramer D. W. Epidemiologic aspects of early menopause and ovarian cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1990; 592: 363-375.
- ¹⁸³ van Asselt K. M., Kok H. S., Putter H., Wijmenga C., Peeters P.H., van der Schouw Y. T. *et al.* Linkage analysis of extremely discordant and concordant sibling pairs identifies quantitative trait loci influencing variation in human menopausal age. *Am. J. Hum. Genet* 2004;74:444-453.
- ¹⁸⁴ van Asselt K. M., Kok H. S., Peeters P. H., Roest M., Pearson P. L., te Velde E. R. *et al.* Factor V Leiden mutation accelerates the onset of natural menopause. *Menopause* 2003;10:477-481.
- ¹⁸⁵ de Bruin J. P., Bovenhuis H., van Noord P. A., Pearson P.L., van Arendonk J. A., te Velde E. R. *et al.* The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum. Reprod* 2001 16, 2014–2018.
- ¹⁸⁶ Snieder H., MacGregor AJ, Spector TD, Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83, 1875-1880.
- ¹⁸⁷ Murabito JM, Yang Q, Fox CS, Cupples LA, Genome-wide linkage analysis to age at natural menopause in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Fertil Steril* 2005 ;84:1674-1679.
- ¹⁸⁸ Shearman A. M., Karasik D., Gruenthal K. M., Demissie S., Cupples L. A., Housman D. E. and Kiel D. P. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J Bone Miner Res* 2004;19:773-781.

- ¹⁸⁹ Kung A.W. C., Lai B.M. H., Ng M. Y. M., Chan V. and Sham P. C. T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures. *Bone* 2006; 39:1097-1106.
- ¹⁹⁰ Ichikawa S., Koller D. L., Peacock M., Johnson M. L., Lai D., Hui S. L. *et al.* Polymorphisms in the estrogen receptor beta ESR2 gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5921-5927.
- ¹⁹¹ Maguire P., Margolin S., Skoglund J., Sun X. F., Gustafsson J. A., Borresen-Dale A. L. and Lindblom A. Estrogen Receptor Beta ESR2: Polymorphisms in Familial and Sporadic Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94:145-152.
- ¹⁹² Maruyama A., Nakayama T., Sato N., Mizutani Y., Furuya K. And Yamamoto T. Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene for preeclampsia. *Hypertens Re* 2004;27: 903-909.
- ¹⁹³ Pirskanen M., Hiltunen M., Mannermaa A., Helisalmi S., Lehtovirta M., Hanninen T. and Soininen H. Estrogen receptor beta gene variants are associated with increased risk of Alzheimer's disease in women. *Eur J Hum Gene* 2005;13:1000-1006.
- ¹⁹⁴ Layman LC. Editorial: BMP15--the first true ovarian determinant gene on the X-chromosome? *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(5):1673-6.
- ¹⁹⁵ Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000; 25:279-83.
- ¹⁹⁶ Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*. 2007;148:393-400.
- ¹⁹⁷ Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM, Persani L. Identification of new variants of human *bmp15* gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1976-9.
- ¹⁹⁸ Laissue P, Christin-Maitre S, Touraine P, Kuttann F, Ritvos O, Aittomaki K, Bourcigaux N, Jacquesson L, Bouchard P, Frydman R, Dewailly D, Reyss AC, Jeffery L, Bachelot A, Massin N, Fellous M, Veitia RA. Mutations and sequence variants in *GDF9* and *BMP15* in patients with premature ovarian failure *Eur J Endocrinol* 2006; 154:739-44.

¹⁹⁹ Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006; 119:408-15.

²⁰⁰ Moron FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Saez ME, Real LM, Gonzalez A, Manes S and Ruiz A. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict overresponse to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16:485-95.

²⁰¹ Chang HW, Chuang LY, Ho CH, Chang PL, Yang CH. Odds ratio-based genetic algorithms for generating SNP barcodes of genotypes to predict disease susceptibility. *OMICS*. 2008;12:71-81.

²⁰² González A, Ramírez-Lorca R, Calatayud C, et al. Association of genetic markers within the BMP15 gene with anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2007 Sep 28.)