

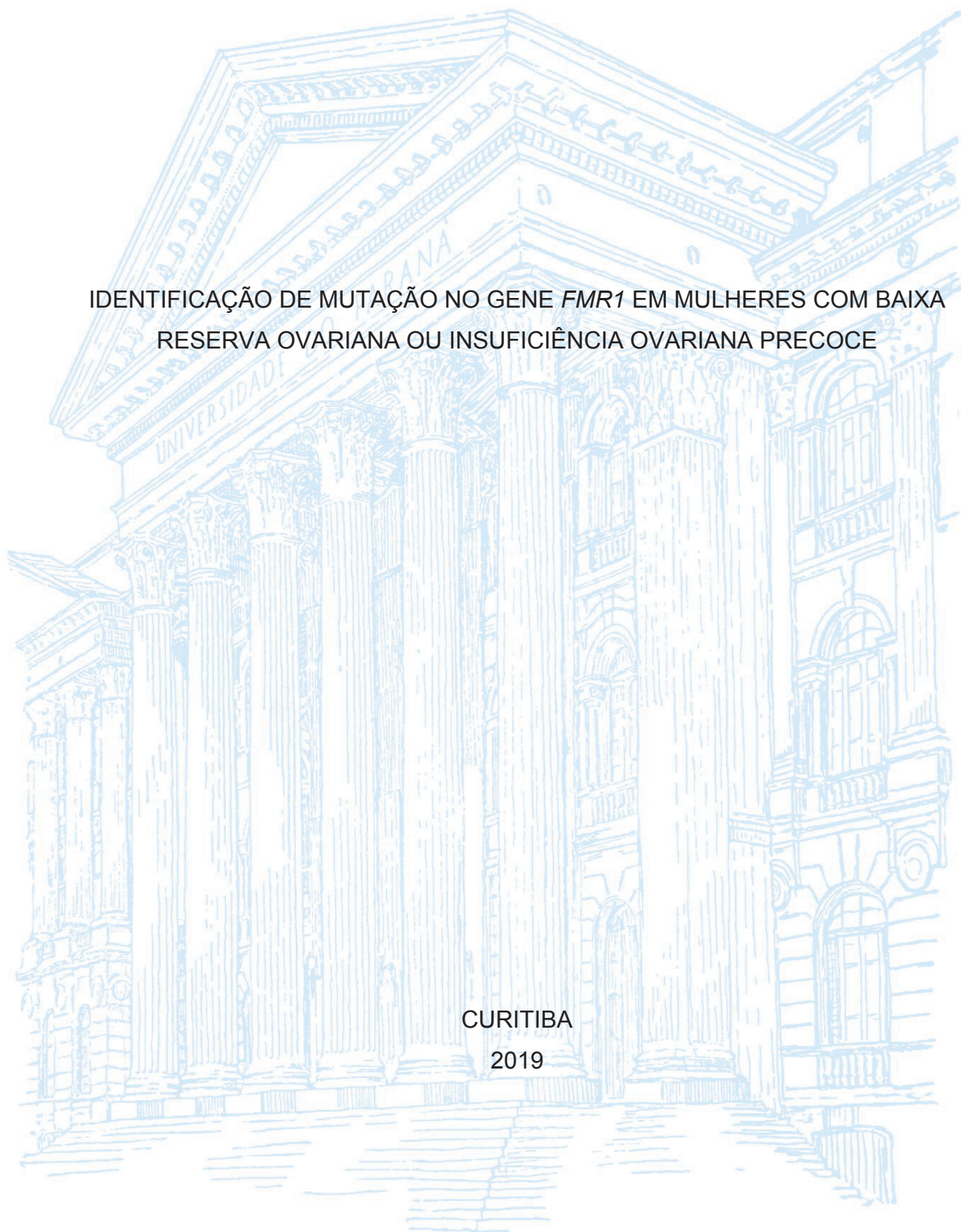
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTHIA RAMOS

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE *FMR1* EM MULHERES COM BAIXA  
RESERVA OVARIANA OU INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE

CURITIBA

2019



CINTHIA RAMOS

IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE *FMR1* EM MULHERES COM BAIXA  
RESERVA OVARIANA OU INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia e Saúde da Mulher.  
Orientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nishihara

CURITIBA

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

R175 Ramos, Cinthia

Identificação de mutação no gene FMR1 em mulheres com baixa reserva ovariana ou insuficiência ovariana precoce [recurso eletrônico] / Cinthia Ramos – Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara

1. Síndrome do cromossomo X frágil. 2. Insuficiência ovariana primária. 3. Reserva ovariana. I. Nisihara, Renato Mitsunori. II. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WP275

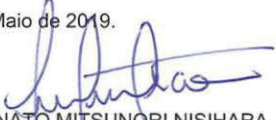
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA JORDÃO  
CRB9/991

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCOTECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CINTHIA RAMOS**, intitulada: **IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO NO GENE FMR1 EM MULHERES COM BAIXA RESERVA OVARIANA OU INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 03 de Maio de 2019.

  
RENATO MITSUNORI NISHIHARA  
Presidente da Banca Examinadora

  
JAN PAWEL ANDRADE PACHNICKI  
Avaliador Externo (UP)

  
ANGELICA BEATE WINTER BOLDT  
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, Celia e Manoel

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Renato Mitsunori Nisihara, exemplo de competência e dedicação profissional, expresso aqui todo o meu carinho e admiração. Obrigada pela convivência, orientação, aprendizado e, sobretudo, por confiar a mim a tarefa de realizar este trabalho. Às supermeninas do Neurogene Laboratório: Ingrid, Maristela, Katia, Tania, Maria João, Tereza e Carol. Muito obrigada pelo maravilhoso convívio, pelas colaborações e, sobretudo pela amizade. A Prof<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Bicalho, obrigada por disponibilizar o laboratório LIGH para realizar as análises e pelo apoio da equipe em especial José Samuel da Silva. A Dra. Viviane Scantamburlo Nomeies e a equipe da Androlab pelo apoio prontamente cedido em todas às vezes solicitadas, atenção dispensada e pelo carinho ao me receber em seu laboratório. A amiga Maristela Ocampos agradeço por toda a atenção, respeito e partilha de conhecimentos, na vida e na profissão. Ao Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho pela oportunidade de fazer parte do programa de pós-graduação. Vinicius Machado Mikosz da coordenação da pós-graduação, além de me auxiliar por diversas vezes nos problemas burocráticos, também foi um amigo.

A PerkinElmer por disponibilizar os Kits FragilEase.

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi identificar o número de CGG no gene *FMR1* em um grupo de mulheres que apresentam Insuficiência Ovariana Precoce (POI, *Primary Ovarian Insufficiency*) ou baixa reserva ovariana. Adicionalmente, avaliar qual o alelo mais frequente no grupo estudado e promover a orientação e aconselhamento genético das mulheres identificadas com mutações no gene *FMR1*.

**Material e Método:** Foram convidadas a participar do estudo 52 mulheres com diagnóstico prévio de POI ou baixa reserva ovariana atendidas no ambulatório de gineco-endocrinologia do Hospital de Clínicas do Paraná – HC/UFPR e em uma clínica de reprodução humana triadas em Curitiba-PR. Todas as participantes foram testadas molecularmente para SXF através das técnicas de PCR-triagem e PCR FragilEase. **Resultados:** Das 52 mulheres analisadas no estudo uma (1,9%) apresentou alelo em pré-mutação e uma (1,9%) alelo na faixa intermediária ou Zona Gray. Os tamanhos de alelos mais frequentes encontrados foram de 28 repetições CGG e 30 repetições de CGG. **Conclusão:** Sugerimos que o teste molecular para SXF tenha um papel na compreensão da etiologia da insuficiência ovariana, assim como na prevenção da transmissão da SXF.

**Descritores:** Síndrome do X-Frágil; Pré-mutação; Insuficiência ovariana precoce, baixa reserva ovariana, gene *FMR1*

## ABSTRACT

**Background:** The objective of this study was to identify the number of CGG in the *FMR1* gene in a group of women with Diminished Ovarian Reserve or Primary Ovarian Insufficiency (POI). In addition, to evaluate the most common allele in the studied group and promote the genetic counseling of women identified with mutations in the *FMR1* gene. **Methods:** Fifty-two women diagnosed with POI or diminished ovarian reserve assisted the Gynaecology- Endocrinology ambulatory at the Clinic Hospital of Paraná - HC / UFPR and at a human reproduction clinic in Curitiba-PR. All participants were molecularly tested for FXS using PCR-screening and FragilEase PCR techniques. **Results:** The result of the 52 women analyzed in this study showed that one (1.9%) premutation allele and one (1.9%) allele in the intermediate range or Gray Zone. The most frequent allele found were 28 CGG repeats and 30 CGG repeats. **Conclusions:** We suggest that molecular diagnose of FXS has a role in the comprehension of the etiology of ovarian insufficiency and in the prevention of transmission of FXS.

**Keywords:** fragile X syndrome, premutation, primary ovarian insufficiency, diminished ovarian reserve, *FMR1* gene

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - ESTRUTURA DO GENE FMR1 E DA PROTEÍNA FMRP.....	20
<b>FIGURA 2</b> - FLUXOGRAMA UTILIZADO NA ANÁLISE LABORATORIAL DO ESTUDO. ....	28
<b>FIGURA 3</b> - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DA PCR DE TRIAGEM PARA PRÉ-MUTAÇÃO DA SXF. MARCADOR MOLECULAR DE 50 PARES DE BASES. COLUNAS 1, 2 E 5 MULHERES HETEROZIGOTAS COM ALELOS NORMAIS. COLUNAS 3 E 4 MULHERES INCONCLUSIVAS. COLUNA 6 MULHER HETEROZIGOTA COM UM ALELO NORMAL E OUTRO PRÉ-MUTADO.....	31
<b>FIGURA 4</b> - ELETROFEROGRAMA PCR FRAGILEASE™. A) MULHER COM UM ALELO NORMAL E OUTRO PRÉ-MUTADO B) MULHER HOMOZIGOTA.....	33
<b>FIGURA 5</b> - ESQUEMA PARA DEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO DAS 52 AMOSTRAS.....	36
<b>FIGURA 6</b> - HEREDOGRAMA REPRESENTATIVO DA FAMÍLIA DA PARTICIPANTE PRÉ-MUTADA.....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....</b>	<b>36</b>
<b>GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DAS AMOSTRAS ESTUDADAS.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG CLASSIFICADOS EM QUATRO CATEGORIAS.....	19
<b>TABELA 2</b> - DIFERENTES METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE SXF .....	25
<b>TABELA 3</b> - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO (N=52).....	37
<b>TABELA 4</b> - CLASSIFICAÇÃO E NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG DAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACMG** - *AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS*

**ACOG** – *AMERICAN CONGRESS OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS*

**ADNPM** – *ATRASO NO DESENVOLVIMENTO NEUROPSICOMOTOR*

**AGG** – *ADENINA-GUANINA-GUANINA*

**AMH** – *ANTIMEULLERIAN HORMONE, HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO*

**CGG** – *CITOCINA-GUANINA-GUANINA*

**DI** – *DEFICIÊNCIA INTELECTUAL*

**DNA** – *DEOXYRIBONUCLEIC ACID*

**DNTP'S** – *DESOXINUCLEOTÍDEOS TRIFOSFATO*

**FMR1** - *FRAGILE X MENTAL RETARDATION 1 GENE*

**FMRP** - *FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN*

**FSH** - *FOLLICLE-STIMULATING HORMONE, HOMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE*

**FXPOI** - *FRAGILE X-ASSOCIATED PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY*

**FXTAS** - *FRAGILE X ASSOCIATED TREMOR/ATAXIA SYNDROME*

**PCR** - *POLIMERASE CHAIN REACTION, REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE*

**POI** – *PRIMARY OVARIAN INSUFFICIENCY, INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE*

**SB** – *SOUTHERN BLOTTING*

**SXF** – *SÍNDROME DO X-FRÁGIL*

**TAE** – *TRIS-ACETATO-EDTA*

**TCLE** – *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO*

**TEA** – *TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA*

**UTR** – *UNTRANSLATED REGION, REGIÃO NÃO TRADUZIDA*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	JUSTIFICATIVA	16
1.2	OBJETIVO PRINCIPAL	16
1.3	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1	A SÍNDROME DO X-FRÁGIL	18
2.2	GENE <i>FMR1</i>	18
2.3	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO NÚMERO DE CGG DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF	19
2.4	PADRÃO DE TRANSMISSÃO DO NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG	20
2.5	INCIDÊNCIA POPULACIONAL DA SXF	21
2.6	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF	21
2.6.1	FXPOI - INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE ASSOCIADA A SÍNDROME DO X-FRÁGIL	22
2.6.2	FXTAS - SÍNDROME DE TREMOR/ATAXIA ASSOCIADO AO X-FRÁGIL	24
2.7	- DIAGNÓSTICO PARA SXF:	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>28</b>
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	28
3.2	CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA	29
3.3	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	29
3.4	PCR DE TRIAGEM INICIAL PARA ALELOS NORMAIS	29
3.5	PCR FRAGILEASE	31
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>47</b>
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	56
	APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	61
	APÊNDICE 3 – CLASSIFICAÇÃO E NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG DAS AMOSTRAS ANALISADAS	65

APÊNDICE 4 – QUESTIONÁRIO.....	68
--------------------------------	----

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do X-frágil (SXF) é considerada a forma mais comum de Deficiência Intelectual (DI) hereditária e a segunda causa de DI de origem genética (SALDARRIAGA et al., 2014), também associada ao autismo (YU; BERRY-KRAVIS, 2014). A SXF é causada na maioria das vezes pela expansão no número de trinucleotídeos Citosina-Guanina-Guanina (CGG) na região 5' não traduzida (UTR, *Untranslated Region*) do gene *Fragile Mental Retardation 1 (FMR1)* localizado no cromossomo Xq27.3. Grandes expansões nesta região estão associadas à hipermetilação da região promotora do gene *FMR1* e subsequente silenciamento da transcrição do gene e ausência da *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*. A FMRP é uma importante proteína envolvida no desenvolvimento de neurônios. A perda de expressão da FMRP causa uma série de manifestações fenotípicas e comportamentais associadas a SXF (ZHANG et al., 2019).

Outras causas menos frequentes como deleções ou mutações pontuais no gene *FMR1* também podem causar a SXF (RZÓNCA et al., 2016).

A classificação dos indivíduos para a SXF é feita pelo número de repetições de CGG, considerando-se como indivíduos normais, os que apresentam número inferior a 45 repetições, indivíduos intermediários ou “Zona Gray”, os com 45 a 54 repetições, indivíduos pré-mutados, aqueles com 55 a 200 repetições e indivíduos com mutação completa (afetados), os que apresentam mais de 200 repetições CGG (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

A pré-mutação está associada a duas condições clínicas bem estabelecidas: a Insuficiência Ovariana precoce associada ao X-Frágil (FXPOI, *Fragile X-associated Primary Ovarian insufficiency*) e a Síndrome de Tremor/Ataxia associada a X-Frágil (FXTAS, *Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome*), assim como outras comorbidades clínicas e psiquiátricas (MILA et al., 2018). A Insuficiência Ovariana Precoce (POI, *Primary Ovarian Insufficiency*) é caracterizada por irregularidade ou ausência dos ciclos menstruais antes dos 40 anos de idade e acomete aproximadamente 1% das mulheres na população em geral. A pré-mutação no gene *FMR1* é responsável por 2 a 11% de POI e representa uma das causas genéticas mais conhecidas de POI (HIPPEL et al., 2016; LAWRENCE M. NELSON, 2009).

Alelos em pré-mutação são instáveis, quando transmitidos pela meiose materna, correm o risco de expandirem para mutação completa nas gerações subsequentes (BIANCALANA et al., 2015). A mutação completa é associada à deficiência intelectual, autismo e características dismórficas como face alongada, orelhas e mandíbulas proeminentes, pés chatos, dentre outras (LOZANO; ROSERO; HAGERMAN, 2014; RAJARATNAM et al., 2017).

O *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e *American Congress of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) recomendam que seja feito teste para diagnóstico da SXF em indivíduos que apresentam DI, autismo, atraso no desenvolvimento, familiares com histórico de SXF ou deficiência intelectual não diagnosticada, ataxia cerebelar, mulheres com POI, baixa reserva ovariana e infertilidade (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). O diagnóstico preciso da SXF é de grande importância, pois possibilita o aconselhamento das famílias afetadas sobre os riscos de recorrência da doença e as possíveis opções reprodutivas (GUTIÉRREZ; BAJAJ; KLUGMAN, 2013)

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A síndrome do X-frágil é uma das causas da POI e de baixa reserva ovariana. Está descrito que há uma elevada prevalência de mulheres portadoras da pré-mutação para SXF na população em geral. Há um alto risco de recorrência familiar da doença. A identificação de mulheres portadoras de pré-mutação para SXF pode possibilitar o aconselhamento genético das famílias afetadas e as possíveis opções reprodutivas.

## 1.2 OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar o número de CGG no gene *FMR1* em um grupo de mulheres com insuficiência ovariana precoce ou baixa reserva ovariana.

## 1.3 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a frequência alélica da população do estudo.
- Realizar a orientação e aconselhamento genético das mulheres identificadas com mutações no gene *FMR1*.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A SXF é considerada a forma mais comum de DI hereditária e é a segunda causa mais frequente de DI de origem genética, superada apenas pela Síndrome de Down (SALDARRIAGA et al., 2014). Além disto, a SXF é considerada uma das principais causas genéticas do autismo (YU; BERRY-KRAVIS, 2014).

A SXF foi mencionada pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell, através da investigação da genealogia de uma família com DI, ligada ao cromossomo X. Devido a este motivo, ficou conhecida por muito tempo pelo nome Síndrome de Martin-Bell (MURRAY et al., 1997). Em 1969 Lubs, utilizando técnicas de citogenética, detectou em membros masculinos de uma família com DI, um sítio frágil no final do braço longo do cromossomo X, que foi denominado pelo autor, como cromossomo X marcador (LUBS, 1969). No início da década de 90, foi constatado que o sítio frágil em questão se localizava no gene *FMR1* situado no cromossomo X, mais especificamente na região Xq27.3 e correspondia a uma “mutação dinâmica” por expansão de trinucleotídeos CGG (VERKERK et al., 1991). Mutações dinâmicas são caracterizadas por expansões de diferentes tipos de seqüência de trinucleotídeos, que são instáveis durante a transmissão genética (BENÍTEZ, 1999).

Atualmente, sabe-se que a SXF é causada em 99% das vezes por uma expansão da seqüência de trinucleotídeos CGG, localizada na região 5' UTR do gene *FMR1*, o outro 1% é causado por deleções ou por mutação pontual no gene (RZÓNCA et al., 2016).

### 2.2 GENE *FMR1*

O gene envolvido na SXF é denominado *FMR1* (OMIM \* 309550), e está localizado no braço longo do cromossomo X, região Xq27.3. O *FMR1* constitui-se em 17 éxons, de ~38 kb. O gene contém uma repetição de CGG polimórfica na região 5' UTR do éxon 1 e também apresenta uma ilha CpG localizada a 250 pb antes da repetição de CGG (EICHLER et al., 1994a). O gene codifica uma proteína conhecida

como *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP). A FMRP pertence à família das ribonucleoproteínas, que são proteínas de ligação a RNA envolvidas na localização e tradução de RNA mensageiro neural (BASSANI et al., 2013). A FMRP possui um conjunto de funções essenciais para a neuroplasticidade e o desenvolvimento de neurônios (ZHANG et al., 2019). A perda da função da FMRP afeta múltiplos estágios do desenvolvimento do cérebro e leva a consequências debilitantes da cognição humana (COOK; NURO; MURAI, 2014).

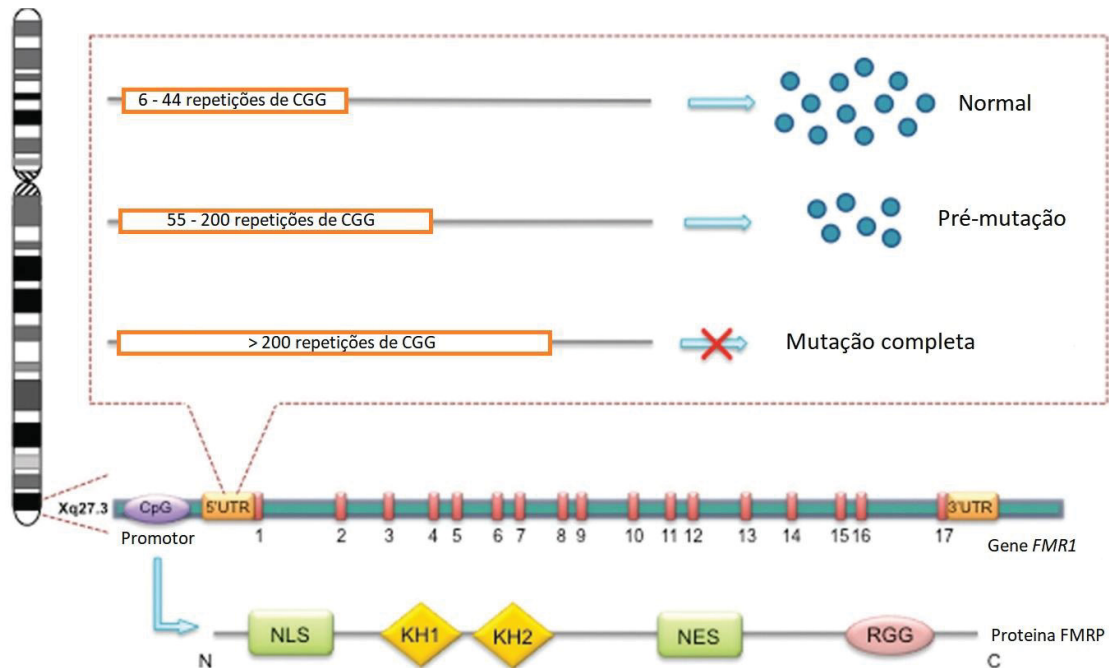
### 2.3 CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO NÚMERO DE CGG DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF

O número de repetições da sequência de trinucleotídeos CGG do gene *FMR1* é polimórfico na população. O ACMG classifica os indivíduos para a SXF em indivíduos normais (6-44 repetições de CGG) sendo 29-30 as repetições mais frequentes na população, indivíduos zona *gray* (45 – 54 repetições de CGG) indivíduos pré-mutados (55 – 200 repetições de CGG) e indivíduos com mutação completa maior de 200 repetições de CGG (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

**TABELA 1 - NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG CLASSIFICADOS EM QUATRO CATEGORIAS**

<b>Número de repetições de CGG</b>	<b>Classificação</b>
6 a 44	Normal
45 a 54	Intermediário / Zona <i>Gray</i>
55 a 200	Pré-Mutação
>200	Mutação Completa (Afetado)

Em indivíduos com alelos normais, zona *gray* e pré-mutados, o gene *FMR1* é transcricional ativo e a proteína FMRP é produzida. No entanto, quando o número de repetições é superior a 200 repetições de CGG, a ilha CpG do gene *FMR1* é metilada. A metilação silencia a transcrição do gene, e como consequência, não há a produção da proteína FMRP. A proteína FMRP é expressa em muitos tecidos, mas é mais abundante no cérebro e no testículo. Além da sua expressão no corpo celular neuronal, a FMRP também é detectada em dendritos e sinapses nervosas. Os sintomas característicos da síndrome parecem estar associados à deficiência da proteína FMRP (BARASOAIN et al., 2016; VERKERK et al., 1991).



**FIGURA 1** - ESTRUTURA DO GENE *FMR1* E DA PROTEÍNA FMRP.

**Nota:** O gene *FMR1* está localizado no cromossomo Xq27.3. O *FMR1* é composto por 17 exons e é caracterizado pela presença de repetições instáveis da sequência CGG polimórfica na 5'UTR. Os alelos normais têm 6 a 44 cópias repetições de CGG, os alelos pré-mutados têm 55 a 200 repetições de CGG e os alelos com mutação total têm mais de 200 repetições de CGG. Enquanto que a condição de pré-mutação causa a diminuição do nível de FMRP (pontos azuis), a condição de mutação total está associada a uma hipermetilação das repetições CGG e da ilha CpG a montante no promotor *FMR1*, causando assim, o silenciamento transcricional do gene. FMRP é composto por um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES), dois domínios de homologia de ribonucleoproteína K (KH1-KH2), um aglomerado de resíduos de arginina e glicina (caixa RGG). Adaptado e modificado de (BASSANI et al., 2013).

## 2.4 PADRÃO DE TRANSMISSÃO DO NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG

A transmissão da repetição de CGG é estável em indivíduos normais, sem nenhuma ou pouca variação no número de repetições de geração para geração. Para os alelos intermediários, subsequentes gerações correm risco de receberem o alelo com a pré-mutação (NOLIN et al., 2003).

O risco de expansão da pré-mutação para a mutação completa ocorre geralmente por transmissão materna durante a meiose. A probabilidade de que a expansão ocorra depende do número de repetições de CGG e número de

---

interrupções Adenina-Guanina-Guanina (AGG) (YRIGOLLEN et al., 2012, 2014). Tipicamente há uma sequência de AGG entre cada 9 ou 10 repetições de CGG no gene *FMR1*. Mulheres pré-mutadas que apresentam interrupções de AGG têm menores riscos de expansão para a mutação completa do que mulheres sem interrupções AGG, pois essas interrupções aumentam a estabilidade e reduzem o risco de expansões (ARDUI et al., 2017; EICHLER et al., 1994b; SALDARRIAGA et al., 2014). O menor tamanho de repetição expandido para mutação completa registrado até agora, em uma única geração, foi de 56 repetições de CGG (FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009).

A transmissão paterna de pré-mutação para mutação completa é rara. Um estudo apresenta um caso de transmissão onde o genitor apresentava mosaïcismo de pré-mutação e mutação completa (88CGG / 134CGG repetições) nas células do sangue e células espermáticas. Normalmente, o homem pré-mutado passa para suas filhas, somente alelos pré-mutados (ALVAREZ-MORA et al., 2017).

## 2.5 INCIDÊNCIA POPULACIONAL DA SXF

A prevalência geral da mutação completa para SXF é estimada em um afetado para cada 4000 homens e uma afetada para cada 5000-8000 mulheres (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Um estudo envolvendo 134.933 amostras de mulheres de diversos grupos populacionais encontrou a frequência de 1:201 mulheres portadoras da pré-mutação (OWENS et al., 2018). Já a frequência de homens pré-mutados é estimada em 1:430 homens. A prevalência para alelos intermediários ou zona *gray* é de 1:66 mulheres e 1:112 homens (TASSONE et al., 2012).

## 2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA SXF

As manifestações clínicas da SXF em indivíduos com mutação completa são diversas, embora alguns sintomas sejam considerados característicos, tais como: DI (leve a moderada), Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM) e Transtorno do Espectro Autista (TEA), que podem ser acompanhados por características dismórficas específicas, como face alongada, orelhas proeminentes,

prognatismo mandibular e macroorquidia nos indivíduos homens (SALDARRIAGA et al., 2014).

Estudos recentes relatam que indivíduos com alelos dentro da zona *gray* ou intermediária apresentam fenótipos semelhantes aos encontrados em pré-mutação, incluindo insuficiência ovariana precoce, doença de Parkinson, distúrbio de aprendizado e comportamento, distúrbio de movimento e perda de memória. (DEBREY et al., 2016; HALL, 2014; STREULI et al., 2009).

A pré-mutação está associada a duas condições clínicas: à Insuficiência Ovariana Precoce associada ao X-Frágil (FXPO, *Fragile X-associated Primary Ovarian insufficiency*) e à Síndrome de Tremor/Ataxia associado ao X-Frágil (FXTAS, *Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome*). Diversos estudos também mostram a relação entre alelos pré-mutados a outras manifestações clínicas, tais como enxaquecas, depressão, ansiedade, hipertensão, fibromialgia, neuropatia, disfunção da tireoide, dentre outras (AU et al., 2013; CAMPBELL et al., 2016; HAMLIN et al., 2012; WHEELER et al., 2014).

#### 2.6.1 FXPOI - INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE ASSOCIADA A SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A POI, anteriormente conhecida como Falência Ovariana precoce, é caracterizada por irregularidade ou ausência dos ciclos menstruais antes dos 40 anos de idade. O diagnóstico é confirmado pelos níveis elevados de hormônio folículo estimulante (FSH, *Follicle-Stimulating Hormone*) >40 IU/l no sangue (QIN et al., 2015). A POI acomete aproximadamente 1% das mulheres, na população em geral (LAWRENCE M. NELSON, 2009). Não existem estudos no Brasil que mostrem a prevalência da POI. A pré-mutação no gene *FMR1* é responsável por 2 a 11% de POI na população branca, representando uma das causas genéticas mais conhecidas de POI (HIPPEL et al., 2016).

A Insuficiência Ovariana Precoce associada ao X-Frágil (OMIM# 311360) afeta aproximadamente 16 a 24% das mulheres pré-mutadas (SULLIVAN; WELT; SHERMAN, 2011). A FXPOI apresenta vários sinais clínicos, tais como: disfunção ovariana, incluindo menstruações irregulares, fases foliculares encurtadas, níveis

---

elevados de FSH e baixos níveis de hormônio anti-mulleriano (AMH, *Antimeullerian Hormone*), baixa reserva ovariana, infertilidade e menopausa (STREULI et al., 2009). A relação entre o tamanho das repetições de CGG e a frequência de FXPOI não é linear. O maior risco para POI é entre alelos com 80 a 100 repetições CGG (MAILICK et al., 2014).

Pesquisas realizadas no Brasil relacionaram a insuficiência ovariana precoce com a pré-mutação no gene *FMR1*, através de um estudo com 101 mulheres portadoras da pré-mutação, das quais 14 tiveram menopausa precoce (VIANNA-MORGANTE et al., 1999). Já em outro, estudo também realizado no Brasil, foram estudadas 58 mulheres com história SXF na família. Destas, 19 eram portadoras da pré-mutação e destas, 11 apresentaram menopausa precoce. Estes dados corroboram a noção de que as mulheres portadoras de alelos na faixa de pré-mutação estão sob alto risco de sofrerem de POI (MACHADO-FERREIRA et al., 2004).

A literatura reporta que portadoras de pré-mutação para SXF apresentam diminuição na reserva ovariana (SULLIVAN; WELT; SHERMAN, 2011). Diferentes mecanismos foram hipotetizados para explicar a diminuição da reserva ovariana em portadoras de pré-mutação. A baixa reserva ovariana descreve mulheres em idade reprodutiva que apresentam menstruação regular, cuja resposta à estimulação ou fecundidade ovariana é reduzida em comparação com mulheres da mesma idade. A reserva ovariana é avaliada por contagem dos folículos antrais, medição dos hormônios FSH, estradiol e AMH (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015).

Como a frequência da pré-mutação para SXF é de aproximadamente 1:201 mulheres (OWENS et al., 2018), o reconhecimento da associação das manifestações clínicas como diminuição na reserva ovariana e POI com a pré-mutação no gene *FMR1* é importante para identificar mulheres pré-mutadas, entre as pacientes com infertilidade, com o objetivo de se fazer um aconselhamento genético adequado e assim, diminuir os riscos de propagação da doença nas gerações futuras.

## 2.6.2 FXTAS - SÍNDROME DE TREMOR/ATAXIA ASSOCIADO AO X-FRÁGIL

A FXTAS (OMIM # 300623) é uma doença neurodegenerativa representada principalmente por tremor de intenção e ataxia cerebelar, que tende a ocorrer após os 50 anos de idade (HOYOS; THAKUR, 2017). Além da ataxia e do tremor, os indivíduos com FXTAS também podem apresentar perda de memória a curto prazo, déficits da função executiva, declínio cognitivo, parkinsonismo, neuropatia periférica, fraqueza muscular proximal do membro inferior (JACQUEMONT et al., 2003). Esta síndrome tem penetrância de 40% em homens pré-mutados e entre 8% a 16% nas mulheres pré-mutadas. A penetrância mais baixa da FXTAS entre as mulheres pode ser explicada pelo efeito protetor do segundo cromossomo X que não tem a pré-mutação (WILLEMSEN ROB, LEVENGA JOSIAN, OOSTRA, 2012). Até o momento, há poucos relatos sobre aspectos da FXTAS no Brasil (CAPELLI et al., 2010).

## 2.7 - DIAGNÓSTICO PARA SXF:

Como os sinais clínicos da SXF são semelhantes aos de outras doenças que apresentam atraso no desenvolvimento; tais como transtorno do espectro autista, déficit de atenção, deficiência intelectual, infertilidade, entre outras, é necessária a confirmação diagnóstica através do exame genético, com técnicas específicas para a SXF, apresentadas na tabela 2.

As técnicas moleculares são as mais utilizadas para diagnóstico da SXF. O teste de triagem é a reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*), que determina o número de repetições de CGG e classifica indivíduos como normais, zona *gray* e pré-mutados. Entretanto essa técnica tem limitações, pois não identifica pré-mutações com alelos maiores de 100-150 repetições de CGG, mutação completa, mulheres homozigotas e a presença de mosaicismo (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010).

A técnica de *Southern Blotting* (SB) ainda é considerada o padrão ouro no diagnóstico da SXF, pois permite detectar alelos maiores difíceis de alcançar por PCR, fornece o estado de metilação do gene *FMR1*, diferencia mulheres com alelos

homozigotos e detecta mosaicismos. No entanto, é um processo dispendioso e demorado que requer uma grande quantidade de DNA genômico (TASSONE, 2015).

Como alternativa à técnica de SB, várias estratégias de diagnóstico baseadas na técnica de PCR-gene específico - *FMR1* obtiveram sucesso nos últimos anos (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010; RAJAN-BABU; CHONG, 2016).

Os kits comerciais para diagnóstico da SXF, disponíveis no mercado, seguem o método de amplificação da região específica do gene *FMR1*, seguida de eletroforese capilar e análise de dados por meio de *software* específicos. São menos laboriosos que a técnica de SB e mais precisos com relação ao número de repetições de CGG. Além disso, é possível identificar alelos normais, intermediários, pré-mutações, mutação completa, homozigose feminina, mosaicismos, padrão de metilação e interrupções de AGG (CHENG et al., 2017).

**TABELA 2 - DIFERENTES METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE SXF**

<b>Alelos</b>	<b>PCR - Convencional</b>	<b>S. Blotting</b>	<b>PCR - gene específico</b>
Normais	Sim	Sim	Sim
Intermediários	Sim	Sim	Sim
Pré-mutação	Sim	Sim	Sim
Mutação completa	Não	Sim	Sim
Metilação	Não	Sim	Sim
AGG	Não	Não	Sim
Mosaicismo	Não	Sim	Sim

Fonte: Adaptado de (TASSONE, 2015).

## 2.8 - ACONSELHAMENTO GENÉTICO

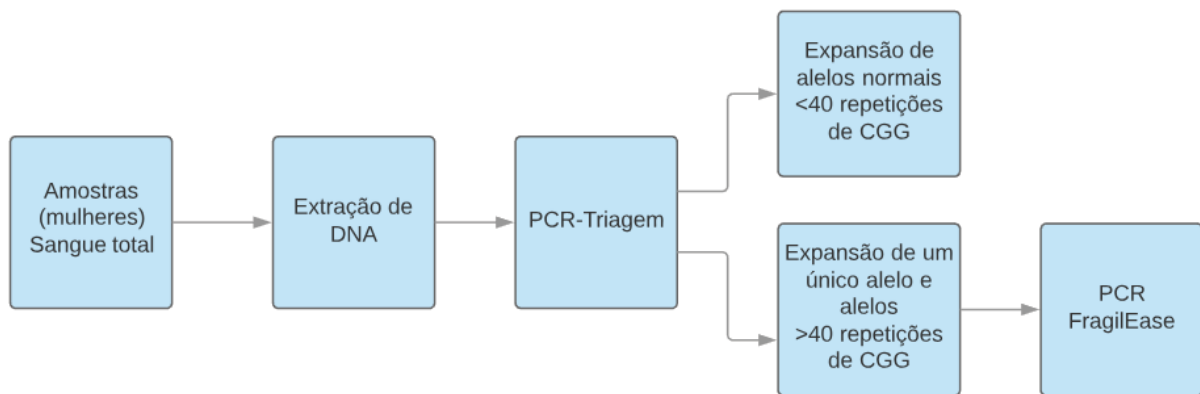
O ACOG, recomenda fazer uma triagem e aconselhamento genético em mulheres e homens que apresentam ou tenham história familiar de SXF, deficiência intelectual, autismo, insuficiência ovariana precoce e níveis aumentados do hormônio FSH antes dos 40 anos, infertilidade ou ataxia cerebelar (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).

Além disso, é importante que as mulheres portadoras da pré-mutação sejam informadas da recorrência familiar da SXF e as opções reprodutivas disponíveis. Algumas mulheres podem optar por não ter filhos ou podem optar em adotar (BIRCH; COHEN; TROLLOR, 2017). Já outras podem considerar os tratamentos de fertilização *in vitro*, incluindo o diagnóstico genético pré-implantação (permitindo testes genéticos de embriões, antes da implantação) (KIEFFER et al., 2015), enquanto outras podem considerar o uso de óvulos ou embriões doados (BIRCH; COHEN; TROLLOR, 2017).

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O recrutamento das participantes e a coleta do sangue foram realizados no ambulatório de Gineco-Endocrinologia do Hospital de Clínicas do Paraná – HC/UFPR e na Androlab Clínica de Reprodução Humana, ambos localizados na cidade de Curitiba – PR. As etapas de extração de DNA e PCR foram realizadas no Neurogene Laboratório, Florianópolis – SC. As técnicas de PCR FragilEase™, eletroforese capilar e análise dos resultados foram realizadas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - Dep. de Genética – UFPR. A análise laboratorial seguiu o fluxograma na figura 2.



**FIGURA 2** - FLUXOGRAMA UTILIZADO NA ANÁLISE LABORATORIAL DO ESTUDO.

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Tocoginecologia e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas do Paraná – HC/UFPR, em 20 de maio de 2017 sob o parecer número 2.074.159 e CAAE 65993417.0.0000.0096 (APÊNDICE 1).

Todos as participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 2).

### 3.2 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Foram convidadas a participar do estudo, 52 mulheres com diagnóstico clínico de POI ou baixa reserva ovariana, atendidas no período de junho de 2017 a dezembro de 2018.

A confirmação prévia da POI foi feita com duas medidas de FSH > 25 UI/L, com intervalo mínimo de quatro semanas, oligo ou amenorreia por pelo menos 4 meses (WEBBER et al., 2016). A reserva ovariana foi avaliada através da contagem dos folículos antrais, realizado por meio de ultrassonografia e dosagem sérica dos hormônios FSH, estradiol e AMH (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2015).

Os critérios de inclusão foram: mulheres com diagnóstico de Insuficiência Ovariana Precoce ou com baixa reserva ovariana, com idades entre 20 a 40 anos, que concordassem em participar do estudo, com a assinatura do TCLE.

Os critérios de exclusão foram: mulheres que no período do estudo estivessem fazendo tratamento quimioterápico, portadoras de doenças autoimunes e portadoras da síndrome de Turner.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O sangue venoso das pacientes incluídas foi coletado em tubos com anticoagulante EDTA. O DNA genômico foi extraído de 300 µl do sangue total conforme protocolo do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). O DNA foi quantificado através do instrumento NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 e diluídos nas concentrações finais de 25-50 ng/µl e estocado à -20°C para posterior utilização nas técnicas moleculares de PCR e PCR FragilEase™.

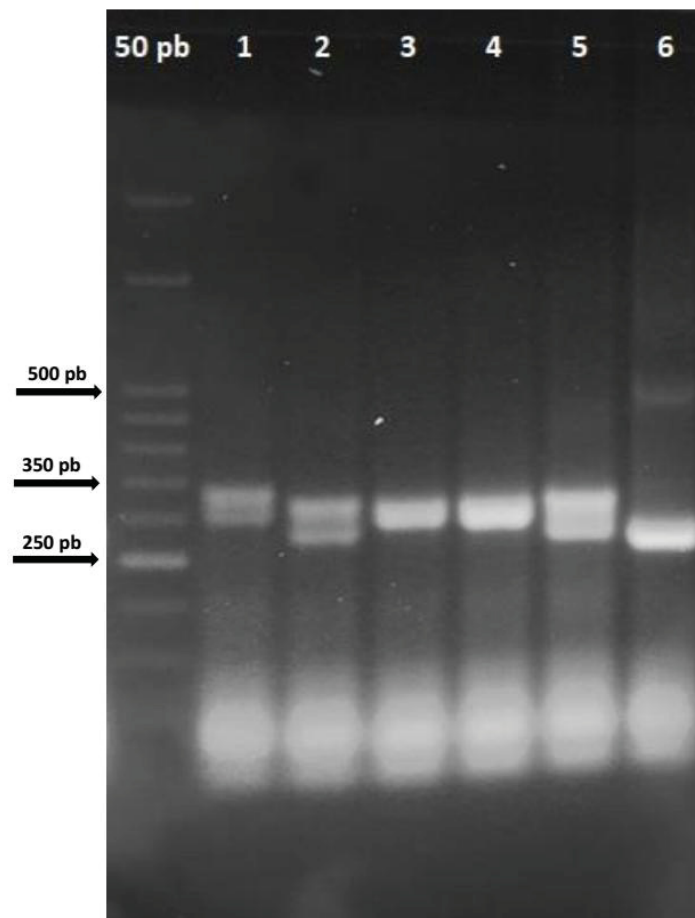
### 3.4 PCR DE TRIAGEM INICIAL PARA ALELOS NORMAIS

Foi realizada PCR de triagem inicial em todas as 52 amostras. As reações de PCR foram conduzidas com os iniciadores C (5'GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT3') e F (5'AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA 3') descritos por (FU et al., 1991).

---

O volume total da reação foi de 30 µl, contendo os produtos do kit Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), utilizando o tampão 2 e 1 U da enzima Taq, 500 µM dNTPs, 2,0 M de betaína (Betaine B0300, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,33 µM de cada iniciador e 100 ng de DNA genômico. As reações seguiram os ciclos de temperatura a seguir: desnaturação a 98°C por 10 minutos; 10 ciclos a 97°C por 35 segundos (desnaturação), 64°C por 35 segundos (anelamento), 68°C por 4 minutos (extensão); 25 ciclos a 97°C por 35 segundos, 64°C por 35 segundos, 68°C por 4 minutos, acrescentando a este último 20 segundos a cada novo ciclo; e finalizado com extensão a 68°C por 10 minutos. O tamanho final esperado de cada produto da PCR é de 221 pares de bases (excluindo as repeti es de CGG) (SALUTO et al., 2005).

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo 0,05 mg de brometo de etídio. A eletroforese ocorreu a 130 V por aproximadamente 60 minutos em tampão TAE 1X e visualizado através de transluminador ultravioleta (UVP, Upland, CA, USA). O tamanho dos fragmentos obtidos, foram determinados utilizando como referência o marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Com o tamanho do fragmento em pares de bases   possível calcular o valor aproximado do número de repeti es de CGG através da fórmula  $N^{\circ} \text{CGG} = (\text{bp} - 221) / 3$  (SALUTO et al., 2005).



**FIGURA 3** - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DA PCR DE TRIAGEM PARA PRÉ-MUTAÇÃO DA SXF. MARCADOR MOLECULAR DE 50 PARES DE BASES. COLUNAS 1, 2 E 5 MULHERES HETEROZIGOTAS COM ALELOS NORMAIS. COLUNAS 3 E 4 MULHERES INCONCLUSIVAS. COLUNA 6 MULHER HETEROZIGOTA COM UM ALELO NORMAL E OUTRO PRÉ-MUTADO.

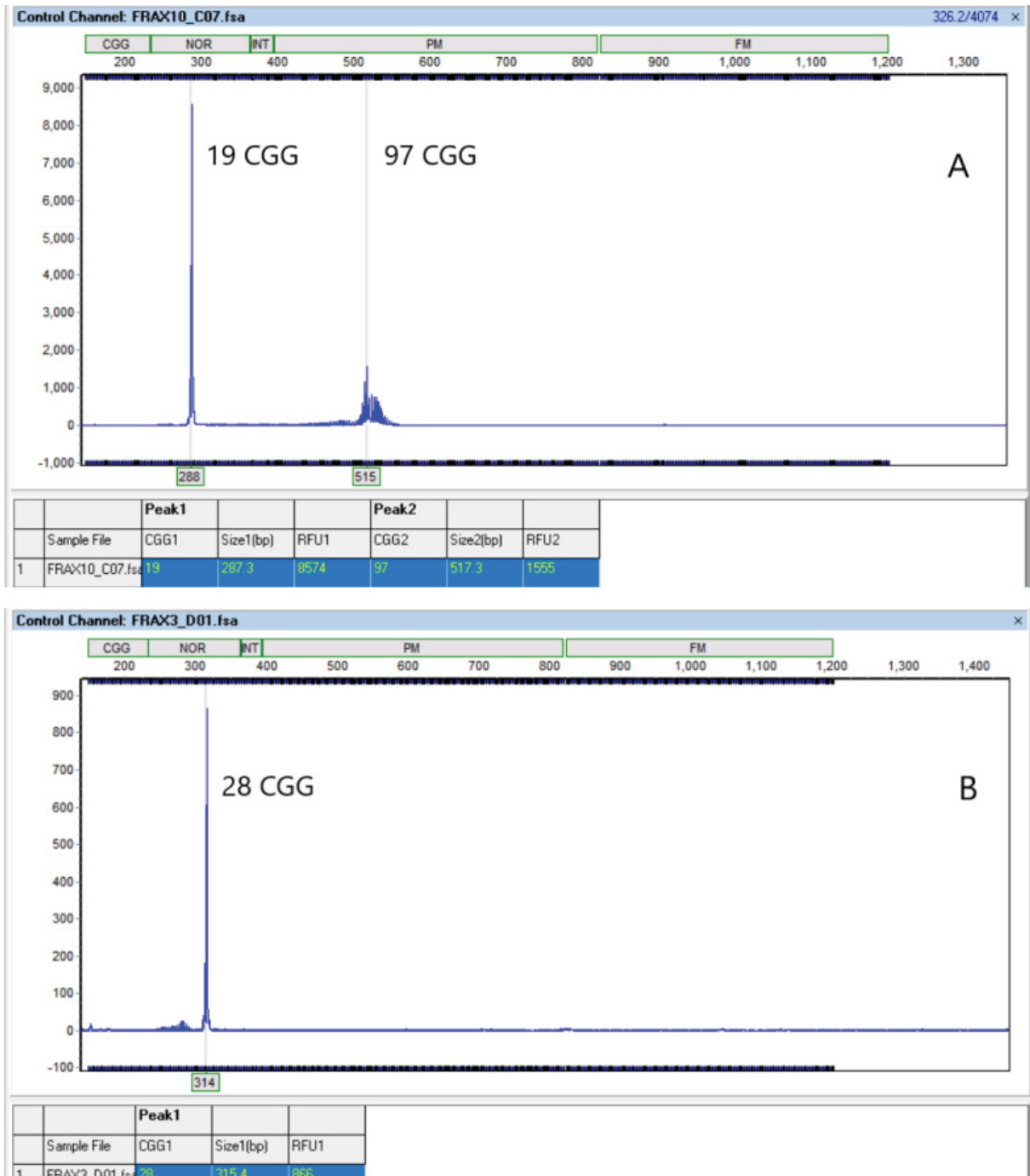
**Fonte:** Os autores

### 3.5 PCR FRAGILEASE

A análise por PCR FragilEase<sup>TM</sup> foi realizada em amostras com resultados de PCR que apresentaram apenas um único alelo de tamanho normal ou um alelo maior que 40 repetições de CGG. O *mix* da reação foi preparado com 15 $\mu$ L de solução tampão PCR, 2,6 $\mu$ L de diluente de amostra e 0,4 $\mu$ L de Taq Polimerase. Foi utilizado 2 $\mu$ L de DNA (25ng/ $\mu$ L) em cada reação. As amostras foram amplificadas com uma etapa inicial de desnaturação 95°C por 5 minutos seguida de 25 ciclos de 98°C por 35 segundos, 59°C por 35 segundos, 72°C por 4 minutos e uma etapa final

de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR FragilEase™ foram submetidos a Eletroforese Capilar (CE) utilizando o equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) com capilares de 50 cm e polímero POP-7 (Applied Biosystems). As amostras foram preparadas utilizando 2µL do produto da PCR com 2µL de LIZ 1200 Size Standard (Thermo Fisher Scientific) e 11µL de Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific). Essas amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos, seguidas de resfriamento a 4°C. As configurações do aparelho ABI 3130 foram: 2.5kv/20 segundos de injeção e 2800 segundos de corrida.

A interpretação dos resultados obtidos pela PCR FragilEase™ detectados pela CE foram analisados com o auxílio do software GeneMarker V2.7.0 (SoftGenetics, LLC, State College, PA, United States). Para calcular o número de CGG das amostras montou-se uma curva de regressão linear, a partir de amostras de referência com tamanhos de repetições CGG conhecidos. As indicações dos genótipos seguiram as diretrizes da ACMG (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013).



**FIGURA 4** - ELETROFEROGRAMA PCR FRAGILEASE<sup>TM</sup>. A) MULHER COM UM ALELO NORMAL E OUTRO PRÉ-MUTADO B) MULHER HOMOZIGOTA.

Fonte: Os autores

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

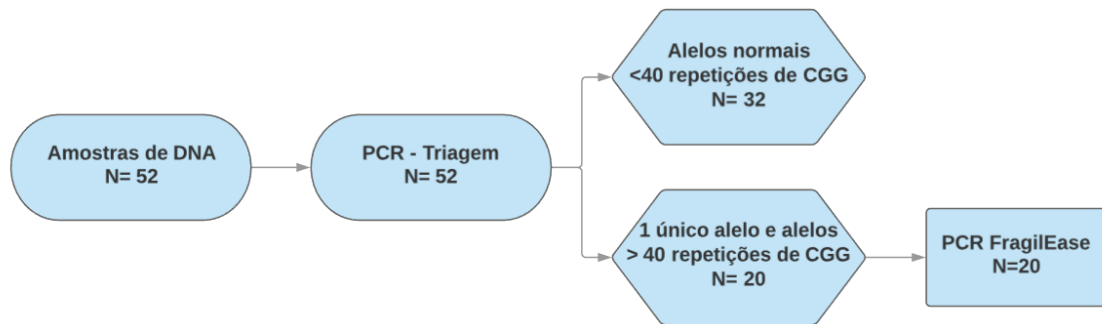
Os dados coletados foram planilhados com auxílio do programa Excel. As análises estatísticas foram descritivas e feitas com o auxílio do programa *Graph Pad*

*Prism 5.0.* As variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  desvio-padrão. As variáveis categóricas foram expressas em porcentagens.

## **4 RESULTADOS**

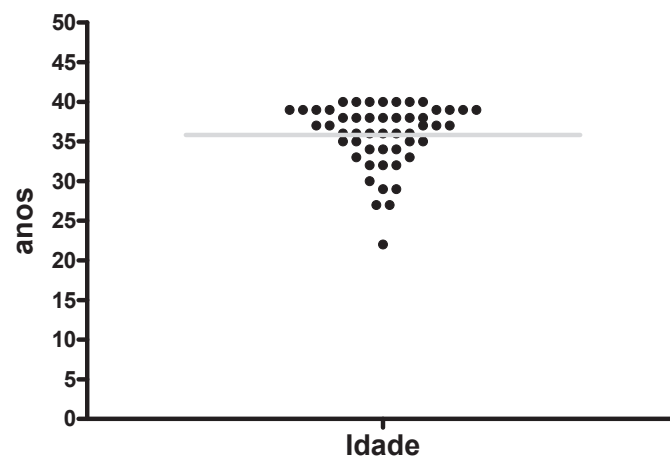
## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das análises das 52 amostras, pelas duas técnicas de PCR, PCR de Triagem (PCR-T) e PCR FragilEase, foram definidos conforme apresentado esquematicamente na figura 5.



**FIGURA 5.** ESQUEMA PARA DEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO DAS 52 AMOSTRAS

Em nosso estudo, todas as 52 participantes foram atendidas por terem história médica de infertilidade, sendo que 86,7% tinham diagnóstico de baixa reserva ovariana e 13,3% diagnosticadas com POI. A média de idade das participantes do estudo foi de  $35,8 \pm 3,97$  anos. Dentre as pacientes, 17/52 (32,7%) tinham menos de 35 anos, as demais tinham entre 35 a 40 anos. A distribuição das idades está representada no Gráfico 1.



**GRÁFICO 1** - DISTRIBUIÇÃO DAS IDADES DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO.

As características clínicas da população estudada estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO (N=52)

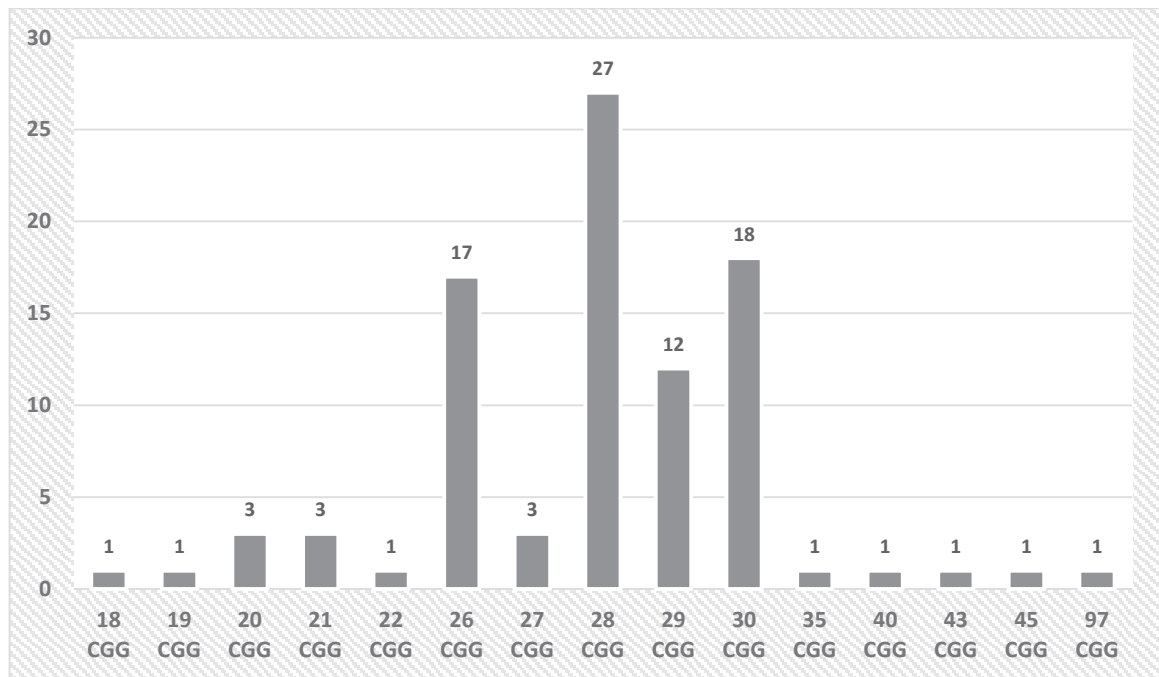
	<b>Proporção (%)</b>
<b>Motivo da consulta</b>	
Infertilidade	52/52 (100%)
<b>Ancestralidade</b>	
Europeia	38/43 (88,37%)
Negra	1/43 (2,32%)
Japonesa	1/43 (2,32%)
Libanesa	3/43 (6,98%)
<b>História familiar</b>	
POI	13/52 (25%)
Deficiência Intelectual	13/52 (25%)
Doença Neurodegenerativa	5/52 (9,6%)
<b>Ciclo Menstrual</b>	
Regular	31/40 (77,5%)
Irregular	8/40 (20,0%)
Amenorreia	1/40 (2,5%)
<b>Dosagem de FSH</b>	
>25 mUI/ml	8/30 (26,6%)
<25 mUI/ml	22/30 (73,4%)
<b>Dosagem de AMH</b>	
>1,0 ng/mL	4/33 (12,1%)
<1,0 ng/mL	29/33 (87,9%)
<b>Dosagem de Estradiol</b>	
<20 pg/mL	5/30 (16,7%)
>20 pg/mL	25/30 (83,3%)

**POI**= Insuficiência Ovariana Precoce, **FSH**= Hormônio Folículo Estimulante, **AMH**= Hormônio anti-mulleriano

Das 52 participantes analisadas no estudo, 50/52 (96,1%) apresentaram alelos normais, entre 18 a 43 repetições de CGG. Duas pacientes (3,8%) apresentaram mutações no gene *FMR1*. Uma participante (1,9%) apresentou alelos com (19/97 repetições de CGG) e foi classificada como portadora de pré-mutação para SXF. No outro caso, encontrou-se alelos com (21/45 repetições de CGG) e foi classificada como portadora de zona *gray*.

Entre as 50 amostras com alelos normais, 13 (26,0%) casos apresentaram alelos em homozigose. A classificação e o número de repetições de CGG das amostras do estudo estão representados na Tabela 4 (APÊNDICE 3).

Os tamanhos de alelos mais frequentes encontrados no estudo foram de 28 repetições CGG e 30 repetições de CGG respectivamente apresentados no Gráfico 2.

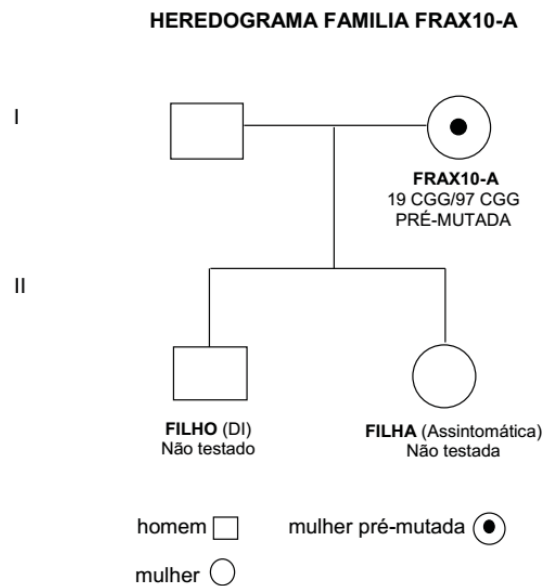


**GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DAS AMOSTRAS ESTUDADAS**

#### *Perfil Clínico da participante identificada com Pré-mutação para SXF*

A participante FRAX10-A tinha 40 anos de idade, apresenta-se em amenorreia, com dosagens de FSH de 138,5 UI/ml e Estradiol 3 pg/mL. O teste molecular PCR-triagem detectou alelo acima de 40 repetições de CGG, para confirmação do resultado a amostra foi testada com a técnica de PCR FragilEase que confirmou alelo na faixa de pré-mutação (19/97 repetições de CGG). Quando entrevistada, a paciente não mencionou história familiar de POI e nem de doenças neurodegenerativas. Relatou ter ancestralidade europeia e possuir dois filhos, um

menino e uma menina, chamando atenção ao fato de o menino apresentar DI. A menina não tinha manifestações clínicas sugestivas da SXF.



**FIGURA 6.** HEREDOGRAMA REPRESENTATIVO DA FAMILIA DA PARTICIPANTE PRÉ-MUTADA

*Perfil Clínico da participante identificada com alelo na faixa intermediária / Zona Gray*

A participante FRAX50-A tinha 37 anos, apresenta ciclo menstrual regular com taxas de FSH 77,34 UI/ml e AMH 0,07 ng/mL. O teste molecular PCR-triagem detectou alelo acima de 40 repetições de CGG e foi confirmado com a técnica FragilEase que confirmou alelo na faixa intermediária (21/45 repetições de CGG). Na entrevista, ela informou ter ancestralidade europeia e não possuir filhos, mencionou ter uma prima com Síndrome de Down e um primo com doença neurodegenerativa.

**5      DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a SXF tem conseguido maior notoriedade nos meios de comunicação e na comunidade médica, principalmente por estar relacionada ao autismo. Na área da saúde da mulher, a associação entre a pré-mutação no gene *FMR1* é uma causa bem estabelecida de infertilidade devido à insuficiência ovariana (GERSAK, 2003; SULLIVAN et al., 2005).

Em nosso estudo, investigamos 52 mulheres com história de baixa reserva ovariana ou POI e encontramos duas participantes com alterações moleculares no gene *FMR1*. Uma (1,9%) com alelo pré-mutado e 1 (1,9%) com alelo intermediário. Em outro estudo realizado no Brasil, analisaram 41 mulheres com POI e encontraram 3 (7,3%) portadoras de pré-mutação e 2 com alelos intermediários (COSTA et al., 2006). A diferença observada na frequência de mutações no gene *FMR1* entre os dois estudos, pode ser justificada pela ancestralidade dos grupos estudados, dado que a literatura reporta diferenças na frequência de portadoras de pré-mutação entre diferentes grupos populacionais (OWENS et al., 2018). Estudos realizados em outros países mostram que a frequência de pré-mutação em mulheres com POI é variável, na China a frequência encontrada foi de 0,7%, no Irã 3,3%, na Eslovênia 4,8% e na Itália 3,0% (ASADI et al., 2018; CHENG et al., 2017; GERSAK, 2003; MAROZZI et al., 2000).

Em relação à idade das pacientes, a média foi de aproximadamente 35 anos, sendo similar à observada em outros estudos (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2009; STREULI et al., 2009). Cerca de um terço das pacientes tinham menos de 35 anos. Embora o diagnóstico de baixa reserva ovariana seja estabelecido, a investigação da SXF em pacientes com infertilidade pode demorar para ser feita, provavelmente pela SXF ainda ser subdiagnosticada no Brasil (TEODORO et al., 2016).

Quando avaliamos os dados coletados, chama atenção a história familiar de POI e de déficit cognitivo (25% para ambas situações). Tais achados podem estar relacionados com a SXF, indicando a realização de testes moleculares.

A taxa de homozigose feminina encontrada no estudo foi de 26%, este resultado é consistente com relatos da literatura que apresentam a homozigose feminina como sendo >20% para um alelo normal (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010).

---

Apesar de alelos em homozigose serem frequentes na população, a identificação desses alelos é um desafio, pois nem todas as técnicas utilizadas para diagnóstico são capazes de detectar com segurança o alelo homozigoto (JUUSOLA et al., 2012).

Os tamanhos de alelos mais frequentes encontrados nesse estudo foram de 28 repetições CGG e 30 repetições de CGG. O número de repetições da seqüência de trinucleotídeos CGG é polimórfica e varia entre as diferentes populações do mundo (PEPRAH, 2012). Os alelos mais frequentes encontrados na população do estudo foram 28 e 30 repetições de CGG. Este resultado pode ser comparado com outros estudos realizados no Brasil, que encontraram frequência alélica de 30 repetições de CGG nas populações do Rio de Janeiro e São Paulo e alelos de 28 e 30 repetições no estado de Santa Catarina (MINGRONI-NETTO et al., 2002; QUEIROZ, MARIANA, 2007; SUCHAROV et al., 1999). Alelos com 29 e 30 cópias de repetições CGG são os mais comuns encontrados nas populações de ancestrais da Europa Ocidental (PEPRAH, 2012).

O teste molecular para SXF tem duplo papel em pacientes com POI ou baixa reserva ovariana. O primeiro é determinar a provável causa da insuficiência ovariana e identificar portadoras de mutações no gene *FMR1* (STREULI et al., 2009). O segundo, uma vez identificada, pré-mutação para SXF a portadora deve receber aconselhamento genético para conhecer e discutir as consequências que tal condição pode trazer para a paciente e seus familiares. As mulheres com tal diagnóstico enfrentam desafios físicos e emocionais em suas vidas. O hipoestrogenismo crônico resultante pode resultar em comprometimento da saúde óssea e aumento do risco cardiovascular (HOYOS; THAKUR, 2017). As questões neuropsiquiátricas incluem risco de desenvolvimento de síndrome do tremor / ataxia associada ao X-Frágil, neuropatia, problemas musculoesqueléticos, aumento da prevalência de ansiedade, depressão e distúrbios do sono, independentemente do estresse de criar um filho com SXF e maior risco de depressão pós-parto (HOYOS; THAKUR, 2017). Dessa forma, os médicos assistentes desempenham um papel importante na supervisão da saúde de mulheres com pré-mutação da SXF. A conscientização desses riscos e a correlação das diversas manifestações podem auxiliar no diagnóstico precoce e na coordenação dos cuidados para essas mulheres e suas famílias.

---

A participante identificada em nosso estudo com pré-mutação foi orientada a procurar aconselhamento genético. Os membros da família da portadora devem ser informados sobre o riscos de herdar mutações no gene *FMR1* e devem ser informados sobre a possibilidade de realizar testes genéticos para SXF .

No caso da participante identificada como zona *gray*, apesar de não apresentar risco de transmissão da mutação completa para futuras gerações, a definição do diagnóstico é igualmente importante, pois alelos em zona *gray* podem apresentar fenótipos semelhantes aos encontrados em pré-mutação (HALL, 2014).

Em relação à metodologia laboratorial para o diagnóstico da pré-mutação, atualmente, recomenda-se que seja feito teste para SXF em pessoas que apresentam DI, autismo, atraso no desenvolvimento, familiares com histórico de SXF ou DI não diagnosticada, ataxia cerebelar e mulheres com infertilidade (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). Muitos laboratórios utilizam a técnica de PCR para determinar o número de repetições de CGG. Entretanto, tal técnica apresenta limitações, pois não diferencia alelos homozigotos em mulheres e dificilmente amplifica alelos maiores de 100-150 repetições de CGG (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010). Quando há necessidade de complementação diagnóstica, usa-se a técnica de SB, que ainda é considerada o padrão ouro para diagnóstico da SXF pois detecta alelos acima de 150 repetições de CGG, mosaicismos e padrão de metilação do gene *FMR1*. No entanto, esse é um método dispendioso, demorado e requer uma grande quantidade de DNA genômico (JUUSOLA et al., 2012; RAJAN-BABU; CHONG, 2016; TASSONE, 2015). Nos últimos anos, foram desenvolvidos *kits* comerciais baseados em PCR que simplificam o fluxo de trabalho no diagnóstico da SXF, que são capazes de detectar mosaicismos, identificar mulheres homozigotas, assim como quantificar com precisão o número de repetições de (CGG) (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010; JUUSOLA et al., 2012; LIM et al., 2017). Tais *kits* visam facilitar o diagnóstico da SXF, substituindo o SB pela maior facilidade na sua execução técnica. Em nosso país, a principal limitação do uso dos *kits* comerciais para diagnóstico da SXF ainda é o alto custo, quando comparados a outras metodologias baseada em PCR. Por esse motivo, ainda se utiliza o PCR como um teste de primeira linha e se houver necessidade de complementação diagnóstica, recorre-se aos *kits FMR1* como teste de segunda linha por serem mais práticos e menos laboriosos que a técnica de SB (MACPHERSON; MURRAY, 2016). Assim, para que

os *kits* comerciais se tornem comercialmente viáveis como testes de primeira linha, é necessário que o custo seja reduzido. No decorrer do presente estudo, os autores realizaram uma investigação comparativa entre as diferentes metodologias para o diagnóstico da SXF (APÊNDICE 5) e concluíram que o *kit* PCR FragilEase™, assim como outros *kits* disponíveis no mercado, é eficiente para detectar as mutações no gene *FMR1* e também simplificar o fluxo de trabalho nos laboratórios que fazem o diagnóstico da SXF.

Os achados do nosso estudo mostraram que 3,8% das pacientes estudadas tinham mutações no gene *FMR1*. Diretrizes mundiais ressaltam a necessidade de se investigar a pré-mutação para SXF em indivíduos que apresentam história familiar ou sinais clínicos sugestivo (MONAGHAN; LYON; SPECTOR, 2013). No nosso entender, as repercussões clínicas para as pacientes e familiares que possuam a pré-mutação justificam a realização do exame.

Cabe salientar que o custo por teste ainda é muito dispendioso para a maioria da população de um país em desenvolvimento. Por outro lado, ainda há muita desinformação da classe médica sobre a disponibilidade do teste genético para diagnóstico da SXF nos planos de saúde e no Sistema Único de Saúde (ANS, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Assim, caso seja indicado, atualmente há boas ferramentas para o diagnóstico preciso da SXF.

Nosso estudo apresenta limitações. Alguns exames (como o AMH) não puderam ser realizados em todas as pacientes. Os dados familiares podem apresentar viés de memória. O número amostral é reduzido e não permite estudo estatístico.

O envolvimento clínico em mulheres portadoras da pré-mutação do *FMR1* constitui atualmente um verdadeiro problema de saúde na sociedade que deve ser levado em conta. É importante ressaltar que, enquanto na SXF há uma perda de função do gene *FMR1*, nas perturbações associadas à pré-mutação há um ganho na função do mRNA do *FMR1*. Atualmente, muitos estudos melhoraram a compreensão da fisiopatologia da SXF e surgiram novas terapias direcionadas a prevenir ou melhorar as manifestações da doença (MILA et al., 2018).

A SXF tem sido mais discutida e apresentada na sociedade brasileira, principalmente pela sua associação com deficiência cognitiva e autismo. Na questão da saúde da mulher, muito ainda temos que conhecer. Serão necessários estudos de coorte para identificar a prevalência da pré-mutação na população brasileira e as

consequências na saúde das mulheres portadoras. Para a prevenção da SXF, é importante a pesquisa da pré-mutação do gene *FMR1* em mulheres em fase fértil, como análise pré-concepcional de rotina. Os avanços nos testes genéticos e a maior disponibilidade representa uma ferramenta importante na prevenção e compreensão da SXF.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- Foram identificadas 2/52 (3,8%) de pacientes com mutação no gene *FMR1* no grupo de mulheres com POI ou baixa reserva ovariana.
- Os tamanhos de alelos mais frequentes encontrados foram de 28 repetições CGG e 30 repetições de CGG.
- As pacientes identificadas com a mutação foram orientadas e receberam aconselhamento genético.

---

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-MORA, M. I. et al. Paternal transmission of a FMR1 full mutation allele. **Am J Med Genet**, n. June, p. 1–3, 2017.
- AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: A committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 3, p. e9–e17, 2015.
- ARDUI, S. et al. Detecting AGG Interruptions in Male and Female FMR1 Premutation Carriers by Single-Molecule Sequencing. **Human Mutation**, v. 38, n. 3, p. 324–331, 2017.
- ASADI, R. et al. Premutations of FMR1 CGG repeats are not related to idiopathic premature ovarian failure in Iranian patients □: A case control study. **Gene**, v. 676, n. July, p. 189–194, 2018.
- AU, J. et al. Prevalence and risk of migraine headaches in adult fragile X premutation carriers. **Clinical Genetics**, v. 84, n. 6, p. 546–551, dez. 2013.
- BARASOAIN, M. et al. Study of the genetic etiology of primary ovarian insufficiency: FMR1 gene. **Genes**, v. 7, n. 12, p. 1–18, 2016.
- BASSANI, S. et al. The Neurobiology of X-Linked Intellectual Disability. **The Neuroscientist**, v. 19, n. 5, p. 541–552, 2013.
- BENÍTEZ, J. Clinical and genetic implications of dynamic mutations in neuropediatric practice. **Rev Neurol**, v. 28, p. 60–63, 1999.
- BIANCALANA, V. et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. **European journal of human genetics** □: **EJHG**, v. 23, n. 4, p. 417–25, 2015.
- BIRCH, R. C.; COHEN, J.; TROLLOR, J. N. Fragile X-associated disorders: Don't miss them. **Australian family physician**, v. 46, n. 7, p. 487–491, 2017.
- CAMPBELL, S. et al. Endocrine dysfunction in female FMR1 premutation carriers:

---

Characteristics and association with ill health. **Genes**, v. 7, n. 11, 2016.

CAPELLI, L. P. et al. The fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS). **The Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome (FXTAS)**, v. 68, n. 5, p. 1–188, 2010.

CHENG, Y. K. Y. et al. Identification of fragile X pre-mutation carriers in the Chinese obstetric population using a robust FMR1 polymerase chain reaction assay: Implications for screening and prenatal diagnosis. **Hong Kong Medical Journal**, v. 23, n. 2, p. 110–116, 2017.

COOK, D.; NURO, E.; MURAI, K. K. Increasing our understanding of human cognition through the study of fragile X syndrome. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 2, p. 147–177, 2014.

COSTA, S. S. et al. The FMR1 premutation as a cause of premature ovarian failure in Brazilian women. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 423–428, 2006.

DEBREY, S. M. et al. Clinical Phenotype of Adult Fragile X Gray Zone Allele Carriers: a Case Series. **Cerebellum**, v. 15, n. 5, p. 623–631, 2016.

EICHLER, E. E. et al. Fine structure of the human FMR1 gene. **Hum Mol Genet**, v. 3, n. 4, p. 684–685, 1994a.

EICHLER, E. E. et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. **Nature Genetics**, v. 8, n. 1, p. 88–94, 1994b.

FERNANDEZ-CARVAJAL, I. et al. Expansion of an FMR1 Grey-Zone Allele to a Full Mutation in Two Generations. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 306–310, jul. 2009.

FILIPOVIC-SADIC, S. et al. A Novel FMR1 PCR Method that Reproducibly Amplifies Fragile X Full Mutations in Concordance with Southern Blotting and Reliably Detects Low Abundance Expanded Alleles. **Clin Chem**, v. 56, n. 3, p. 399–408, 2010.

FU, Y. H. et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1047–58, 1991.

---

GERSAK, K. Fragile X premutation in women with sporadic premature ovarian failure in Slovenia. **Human Reproduction**, v. 18, n. 8, p. 1637–1640, 2003.

GLEICHER, N.; WEGHOFER, A.; BARAD, D. H. A pilot study of premature ovarian senescence: I. Correlation of triple CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Müllerian hormone. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5, p. 1700–1706, 2009.

GUTIÉRREZ, J. F.; BAJAJ, K.; KLUGMAN, S. D. Prenatal screening for fragile x: carriers, controversies, and counseling. **Reviews in obstetrics & gynecology**, v. 6, n. 1, p. e1-7, 2013.

HALL, D. A. In the Gray Zone in the Fragile X Gene: What are the Key Unanswered Clinical and Biological Questions? **Tremor and other hyperkinetic movements (New York, N.Y.)**, v. 4, p. 208, 2014.

HAMLIN, A. A. et al. Hypertension in FMR1 premutation males with and without fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 6, p. 1304–1309, 2012.

HIPP, H. S. et al. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI). **Menopause (10723714)**, v. 23, n. 9, p. 993–999, 2016.

HOYOS, L. R.; THAKUR, M. Fragile X premutation in women: recognizing the health challenges beyond primary ovarian insufficiency. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 3, p. 315–323, 2017.

JACQUEMONT, S. et al. Fragile X Premutation Tremor/Ataxia Syndrome: Molecular, Clinical, and Neuroimaging Correlates. **Am. J. Hum. Genet**, v. 72, p. 869–878, 2003.

JUUSOLA, J. S. et al. Performance evaluation of two methods using commercially available reagents for PCR-based detection of FMR1 mutation. **The Journal of molecular diagnostics** □: **JMD**, v. 14, n. 5, p. 476–86, 2012.

KIEFFER, E. et al. Improving preimplantation genetic diagnosis for Fragile X

---

syndrome: two new powerful single-round multiplex indirect and direct tests. **European Journal of Human Genetics**, v. 0033, n. April, p. 1–7, 2015.

LAWRENCE M. NELSON, M. D. NIH Public Access. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 11, p. 606–614, 2009.

LIM, G. X. Y. et al. Validation of a commercially available test that enables the quantification of the numbers of CGG trinucleotide repeat expansion in FMR1 gene. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

LOZANO, R.; ROSERO, C. A.; HAGERMAN, R. J. Fragile X spectrum disorders. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 3, n. 4, p. 134–146, 2014.

LUBS, H. A. A marker X chromosome. **American journal of human genetics**, v. 21, n. 3, p. 231–244, 1969.

MACHADO-FERREIRA, M. DO C. et al. Premature ovarian failure and FRAXA premutation: Positive correlation in a Brazilian survey. **American Journal of Medical Genetics**, v. 126A, n. 3, p. 237–240, 2004.

MACPHERSON, J. N.; MURRAY, A. Development of genetic testing for fragile X syndrome and associated disorders, and estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations. **Genes**, v. 7, n. 12, 2016.

MAILICK, M. R. et al. Curvilinear association of CGG repeats and age at menopause in women with FMR1 premutation expansions. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 165, n. 8, p. 705–711, dez. 2014.

MAROZZI, A. et al. Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation. **Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 197–202, 2000.

MILA, M. et al. Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 2, p. 197–205, fev. 2018.

MINGRONI-NETTO, R. C. et al. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. **American Journal of Medical Genetics**, v. 111, n. 3, p. 243–252, 2002.

---

MONAGHAN, K. G.; LYON, E.; SPECTOR, E. B. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. **Genetics in medicine** □: **official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 15, n. 7, p. 575–86, 2013.

MURRAY, J. et al. Screening for fragile X syndrome. **Health technology assessment (Winchester, England)**, v. 1, n. 4, 1997.

NOLIN, S. L. et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 2, p. 454–464, 2003.

OWENS, K. M. et al. FMR1 premutation frequency in a large , ethnically diverse population referred for carrier testing. n. February, p. 1–5, 2018.

PEPRAH, E. Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution Among World Populations. **Annals of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 178–191, 2012.

QIN, Y. et al. Genetics of primary ovarian insufficiency: New developments and opportunities. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 787–808, 2015.

QUEIROZ, MARIANA, A. Avaliação de Pré-mutação por PCR na Síndrome do X-Frágil. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 291, 2007.

RAJAN-BABU, I. S.; CHONG, S. S. Molecular correlates and recent advancements in the diagnosis and screening of FMR1-related disorders. **Genes**, v. 7, n. 10, p. 1–23, 2016.

RAJARATNAM, A. et al. Fragile X syndrome and fragile X-associated disorders. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 2112, 2017.

RZÓNCA, S. O. et al. Towards a better molecular diagnosis of FMR1-related disorders—a multiyear experience from a reference lab. **Genes**, v. 7, n. 9, 2016.

SALDARRIAGA, W. et al. Fragile X syndrome. **(Cali, Colombia)**, v. 45, n. 4, p. 190–8, 2014.

---

SALUTO, A. et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. **The Journal of molecular diagnostics** □: **JMD**, v. 7, n. 5, p. 605–12, 2005.

STREULI, I. et al. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 2, p. 464–470, 2009.

SUCHAROV, C. C. et al. Fragile X trinucleotide repeats from a normal population in Rio de Janeiro, Brazil. **Hereditas**, v. 130, n. 2, p. 189–190, 1999.

SULLIVAN, A. K. et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. **Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 402–412, 2005.

SULLIVAN, S.; WELT, C.; SHERMAN, S. FMR1 and the Continuum of Primary Ovarian Insufficiency. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 29, n. 04, p. 299–307, 2011.

TASSONE, F. et al. FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. **Genome medicine**, v. 4, n. 12, p. 100, 2012.

TASSONE, F. Advanced technologie for the molecular diagnosis of fragile X syndrome. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 15, n. 11, p. 1465–1473, 2015.

TEODORO, M. A. D. G. L. S. et al. Standardization of capillary electrophoresis for diagnosis of fragile X syndrome in the Brazilian public health system. **Electrophoresis**, v. 37, n. 23–24, p. 3076–3078, 2016.

VERKERK, A. J. M. H. et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 905–914, 1991.

VIANNA-MORGANTE, A. M. et al. Premature menopause in fragile X carriers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 471–474, 1999.

WEBBER, L. et al. ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 31, n. 5, p. 926–937, 2016.

WHEELER, A. C. et al. Associated features in females with an FMR1 premutation. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2014.

WILLEMSEN ROB, LEVENGA JOSIAN, OOSTRA, A. BEN. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. **Clin Genet**, v. 80, n. 3, p. 214–225, 2012.

YRIGOLLEN, C. M. et al. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 29, n. 8, p. 997–1003, 2012.

YRIGOLLEN, C. M. et al. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 6, n. 1, p. 20, 2014.

YU, T.; BERRY-KRAVIS, E. Autism and Fragile X Syndrome. **Seminars in Neurology**, v. 34, n. 03, p. 258–265, 5 set. 2014.

ZHANG, J. et al. Expression and Characterization of Human Fragile X Mental Retardation Protein Isoforms and Interacting Proteins in Human Cells. **Proteomics Insights**, v. 10, p. 117864181882526, 2019.

### Recursos da Internet

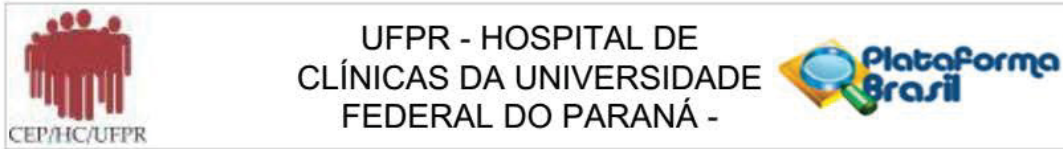
Nota técnica 876/2014. **Agência Nacional de Saúde Suplementar**. Disponível em: <<http://www.ans.gov.br>> Acesso em: 10 de março de 2019

Portaria 981/2014. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <<http://www.portalms.saude.gov.br>> Acesso em: 10 de março de 2019

OMIM. **Online Mendelian Inheritance in Man**. Disponível em: <<https://www.omim.org/>> Acesso em: 10 de março de 2019

## **1 APÊNDICE**

## APÊNDICE 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM MULHERES COM INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE

**Pesquisador:** Renato Mitsunori Nisihara

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65993417.0.0000.0096

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.074.159

#### Apresentação do Projeto:

Avaliação de um novo método molecular para diagnóstico da Síndrome do X-Frágil em mulheres com Insuficiência Ovariana Precoce

#### Objetivo da Pesquisa:

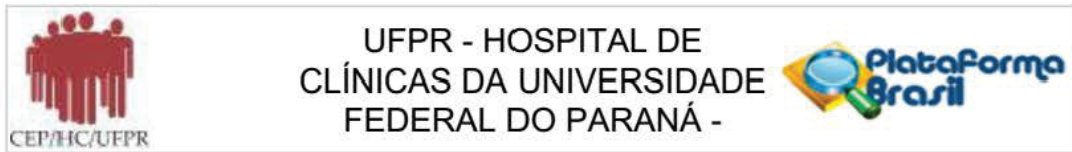
Determinar a eficiência e aplicabilidade de um novo método molecular para o diagnóstico da Síndrome do X-Frágil (SXF), comparando-se com as técnicas de PCR Pré-mutação (PCR-P) e Southern-Blotting (SB) estudando mulheres com Insuficiência Ovariana Precoce (POI).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não serão realizados procedimentos além dos acordados previamente com os pacientes, descritos no TCLE. Como o projeto envolve diagnóstico genético, isso pode gerar ansiedade em algumas das participantes. Para diminuir esse desconforto todas as participantes receberão dos pesquisadores, explicações sobre a Síndrome do X-frágil.

Em um período de aproximadamente 6 meses, seja na consulta periódica no ambulatório, ou por marcação de consulta via telefone, as pacientes serão informadas por um membro da equipe do

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.074.159

projeto se possuem ou não a mutação (alteração) no gene FMR-1.

Quando o exame for positivo, (constatada a alteração) as pacientes "alteradas" serão orientadas por um médico assistente quanto a tratamentos, opções reprodutivas e orientação familiar. Já se o exame for negativo, isso significa que as pacientes não correm o risco de passar a alteração para seus filhos.

A coleta de material será realizada através da punção digital e posterior transferência para o papel cartão FTA. Complicações em virtude da coleta de sangue digital são raras e de pequeno porte, mas existe a possibilidade de leve sensação de dor no local decorrente da punção. Raramente, pode ocorrer infecção local. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser inadequada para análise.

-Benefícios A síndrome do X-Frágil é considerada a causa mais comum de deficiência intelectual (DI) passada de pais para filhos, além de ser uma das causas da Insuficiência Ovariana Precoce (cessação da menstruação antes dos 40 anos de idade). Devido à alta incidência de mulheres portadoras da pré-mutação para SXF sem diagnóstico na população em geral e ao alto risco dessas mulheres passarem a síndrome do X-frágil para seus filhos, o diagnóstico preciso da SXF é de grande importância, pois possibilita a orientação das mulheres portadoras e seus familiares quanto a tratamentos e possíveis opções reprodutivas, prevenindo a transmissão do gene mutado (alterado) para as próximas gerações.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trabalho prospectivo não randomizado com importante interesse clínico

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentações foram cumpridas

**Recomendações:**

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

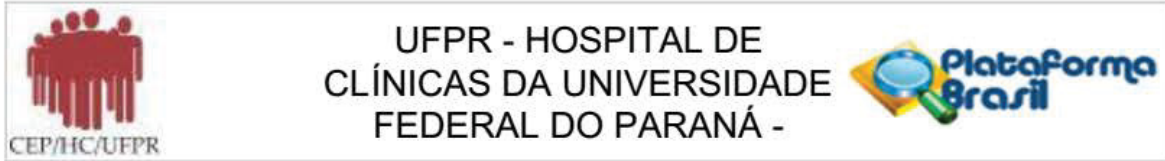
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências ou inadequações

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181  
**Bairro:** Alto da Glória **CEP:** 80.060-900  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.074.159

CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_852461.pdf	21/03/2017 08:17:37		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEnew.docx	21/03/2017 08:17:18	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Neurogene.pdf	14/03/2017 15:52:04	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Labgenetica.pdf	14/03/2017 15:51:52	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DTG.pdf	14/03/2017 15:46:57	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	14/03/2017 15:46:34	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracoes.pdf	13/03/2017 12:20:28	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	12/03/2017 17:16:01	CINTHIA RAMOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

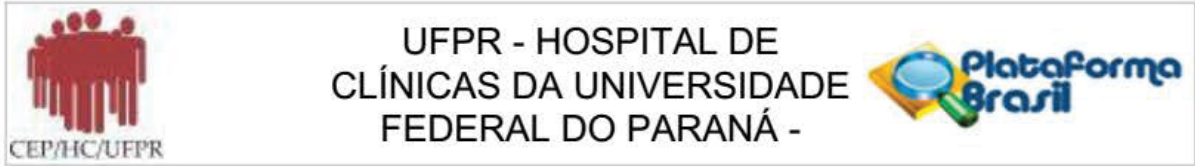
**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.074.159

CURITIBA, 20 de Maio de 2017

---

**Assinado por:**  
**maria cristina sartor**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Gal. Carneiro, 181

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-900

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-1041

**Fax:** (41)3360-1041

**E-mail:** cep@hc.ufpr.br

## **2 APÊNDICE**

## APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** AVALIAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM MULHERES COM INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE

**Investigadores:** Prof.Dr. Renato Nisihara; Prof. Dr. Jaime Kulak Junior e Prof. Dra. Maria da Graça Bicalho

Email: [renatonisihara@gmail.com](mailto:renatonisihara@gmail.com); [jaimekulak@gmail.com](mailto:jaimekulak@gmail.com); [mgbicalho@gmail.com](mailto:mgbicalho@gmail.com)

**Local da Pesquisa:** Ambulatório de Gineco-Endocrinologia – HC – UFPR

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - Dep. de Genética – UFPR

Neurogene Laboratório – Florianópolis - SC

**Telefones:** Ambulatório de Gineco-Endocrinologia: (41) 3360-7873 horário de atendimento 08:00 às 17:00 horas.

Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade: (41) 3361-1771 horário de atendimento 08:00 às 17:00 horas.

Neurogene Laboratório: (48) 3223-0229 horário de atendimento 08:00 às 17:00 horas.

Dr. Renato Nisihara – 41 999119572 celular

Dr. Jaime Kulak Jr. – 41 999760320 celular

1) Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

2) O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

3) A Síndrome do X-frágil é uma alteração no cromossomo X que pode causar a Insuficiência Ovariana Precoce (POI)

4) Algumas mulheres possuem a alteração, mas não apresentam a doença. Essas pessoas correm o risco de passar a modificação para seus filhos, que poderão apresentar os sinais clínicos da Síndrome do X-frágil.

5) Aproximadamente 20% das mulheres com a alteração possuem Insuficiência Ovariana Precoce. Mulheres com infertilidade podem fazer o teste, que é realizado a partir da coleta de sangue do dedo da mulher, seguida de análise do DNA.

6) O objetivo do presente estudo é determinar a eficiência e aplicabilidade de um novo método molecular para o diagnóstico da Síndrome do X-frágil, comparando-se com outras técnicas moleculares estudando mulheres com Insuficiência Ovariana Precoce (POI).

7) Você será incluído no estudo se for Mulher (adulta) e for diagnosticada com Insuficiência Ovariana Precoce. Não participarão do estudo mulheres que estejam fazendo tratamento quimioterápico, sofram de doenças autoimunes e portadoras da síndrome de Turner.

Rubrica Paciente: \_\_\_\_\_

Rubrica Pesquisador: \_\_\_\_\_

8) As participantes do estudo coletarão sangue através de uma picada no dedo. O risco de complicações em virtude deste tipo de coleta são raras e de pequeno porte, mas existe a possibilidade de leve sensação de dor no local decorrente da punção.

9) Como o projeto envolve diagnóstico genético, isso pode gerar ansiedade em algumas das participantes. Para diminuir esse desconforto todas as participantes receberão dos pesquisadores, explicações sobre a Síndrome do X-frágil. Em aproximadamente 6 meses as pacientes, seja na consulta periódica no ambulatório, ou por marcação de consulta via telefone, as pacientes serão informadas por um membro da equipe do projeto se possuem ou não a mutação (alteração) no gene FMR-1.

10) Se o exame for positivo as pacientes serão orientadas por um médico assistente sobre o significado desse achado. Se o exame for negativo, isso significa que as pacientes não correm o risco de passar a alteração para seus filhos. Em caso de dúvidas você poderá perguntar ao médico assistente na consulta ou telefonar/enviar email para os pesquisadores (nomes, telefones, email na primeira página).

11) Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

12) Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

13) Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

14) O investigador responsável pelo estudo e equipe irão coletar informações sobre você no prontuário médico. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com o médico do estudo.

15) Se você tiver outras dúvidas a respeito da Síndrome do X-frágil, pode procurar mais informações nos sites: [www.xfragilsc.com.br](http://www.xfragilsc.com.br), [www.xfragil.org.br](http://www.xfragil.org.br), [www.eudigox.com.br](http://www.eudigox.com.br)

16) Se você tem alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe (nomes, telefones, email na primeira página).

17) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: (41) 360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

Rubrica Paciente: \_\_\_\_\_

Rubrica Pesquisador: \_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:**

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma via assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
Nome do paciente	Assinatura	Data
_____	_____	_____
Nome do Investigador	Assinatura	Data

### **3 APÊNDICE**

### APÊNDICE 3 - TABELA 4

**TABELA 4** - CLASSIFICAÇÃO E NÚMERO DE REPETIÇÕES DE CGG DAS AMOSTRAS ANALISADAS

ID. AMOSTRA	REPETIÇÕES DE CGG		CLASSIFICAÇÃO
	Alelo 1	Alelo 2	
FRAX1-H	20 CGG	27 CGG	Normal
FRAX2-H	28 CGG	28 CGG	Normal
FRAX3-H	28 CGG	28 CGG	Normal
FRAX4-H	18 CGG	28 CGG	Normal
FRAX5-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX6-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX7-A	28 CGG	29 CGG	Normal
FRAX8-A	28 CGG	29 CGG	Normal
FRAX9-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX10-A	19 CGG	97 CGG	Pré-Mutado
FRAX11-A	22 CGG	35 CGG	Normal
FRAX12-A	26 CGG	30 CGG	Normal
FRAX13-A	21 CGG	21 CGG	Normal
FRAX14-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX15-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX16-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX17-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX18-A	28 CGG	28 CGG	Normal
FRAX19-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX20-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX21-A	20 CGG	28 CGG	Normal
FRAX22-A	28 CGG	28 CGG	Normal
FRAX23-A	28 CGG	40 CGG	Normal
FRAX24-A	21 CGG	27 CGG	Normal
FRAX25-A	26 CGG	30 CGG	Normal
FRAX26-A	30 CGG	43 CGG	Normal
FRAX27-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX28-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX29-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX30-A	30 CGG	30 CGG	Normal
FRAX31-A	30 CGG	30 CGG	Normal
FRAX32-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX33-A	28 CGG	30 CGG	Normal

---

FRAX34-A	30 CGG	30 CGG	Normal
FRAX35-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX36-A	29 CGG	29 CGG	Normal
FRAX37-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX38-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX39-A	30 CGG	30 CGG	Normal
FRAX40-A	26 CGG	28 CGG	Normal
FRAX41-A	30 CGG	30 CGG	Normal
FRAX42-A	28 CGG	26 CGG	Normal
FRAX43-A	28 CGG	28 CGG	Normal
FRAX44-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX45-A	28 CGG	29 CGG	Normal
FRAX46-A	26 CGG	29 CGG	Normal
FRAX47-A	27 CGG	29 CGG	Normal
FRAX48-A	30 CGG	26 CGG	Normal
FRAX49-A	20 CGG	29 CGG	Normal
FRAX50-A	21 CGG	45 CGG	Zona Gray
FRAX51-A	28 CGG	30 CGG	Normal
FRAX52-A	30 CGG	30 CGG	Normal

---

## **4 APÊNDICE**

## APÊNDICE 4 - QUESTIONÁRIO

Projeto: **AVALIAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM MULHERES COM INSUFICIÊNCIA OVARIANA PRECOCE**

### QUESTIONÁRIO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome completo do paciente: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: ( ) \_\_\_\_\_ ( ) \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_

E-MAIL: \_\_\_\_\_

#### DADOS CLINICOS

Com qual idade obteve o diagnóstico de Insuficiência Ovariana Precoce? \_\_\_\_\_

Possui filhos biológicos? \_\_\_\_\_

Já teve abortos espontâneos? \_\_\_\_\_

Possui casos de Insuficiência Ovariana Precoce na família? ( ) sim ( ) não

Em caso positivo, grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Possui casos de Deficiência Intelectual na família? ( ) sim ( ) não

Em caso positivo, grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Possui casos de doença neurodegenerativa na família? ( ) sim ( ) não

Em caso positivo, grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Possui consanguinidade familiar? ( ) sim ( ) não