



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA**  
**LABORATÓRIO DE NEUROGENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO**

**DAIANE DE ANDRADE**

**FENÓTIPOS EM PORTADORAS BRASILEIRAS DA PRÉ-MUTAÇÃO DA  
SÍNDROME DO X-FRÁGIL**

**FLORIANÓPOLIS**  
**DEZEMBRO/2012**

**DAIANE DE ANDRADE**

**FENÓTIPOS EM PORTADORAS BRASILEIRAS DA PRÉ-MUTAÇÃO DA  
SÍNDROME DO X-FRÁGIL**

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção parcial do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina e cumprimento da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016).

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dra. Angelica Francesca Maris**  
Coorientadora: **Ma. Ingrid Tremel Barbato**

**FLORIANÓPOLIS**  
**DEZEMBRO/2012**

**Daiane de Andrade**

**Fenótipos em portadoras brasileiras da pré-mutação da síndrome do X-Frágil**

Esta monografia foi julgada e aprovada para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dra. Angelica Francesca Maris  
Orientadora

---

Ma. Ingrid Tremel Barbato  
Coorientadora

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Angelica Francesca Maris - Presidente (UFSC)

---

Profa. Dra. Gisele Serpa - Membro Titular (IFSC)

---

Dra. Louise Lapagesse de Camargo Pinto - Membro Titular (Hospital Infantil-Florianópolis)

Florianópolis, Dezembro de 2012.

Este trabalho é parte integrante de pesquisas realizadas no Laboratório de Neurogenética do Desenvolvimento do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, da Universidade Federal de Santa Catarina em parceria com o Laboratório de Genética Humana Neurogene.

## **Agradecimentos**

*Meu imenso agradecimento a **Deus**, porque sem **Ele**, eu sei que nada teria conseguido.*

*À minha **Mãe**, eterna amiga, pelo apoio incondicional e por sempre ter acreditado em mim, até mesmo nos momentos mais difíceis.*

*À Prof.<sup>a</sup> Dra. **Angelica Francesca Maris** pela orientação, ensinamentos transmitidos e a amizade construída durante a pesquisa.*

*À grande amiga e mentora Ma. **Ingrid Tremel Barbato**, pela coorientação. Sem você, esta pesquisa sequer teria existido. Conversas, ideias, auxílios, correções... Além da amizade que construímos ao longo deste tempo, pude ter a oportunidade de presenciar um grande exemplo de luta e de dedicação na ajuda às famílias com a Síndrome do X-Frágil. Que você possa continuar com este trabalho admirável do X-Frágil por muito tempo!*

*Aos membros da banca examinadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. **Gisele Serpa** e Dra. **Louise Lapagesse de Camargo Pinto** pela honra em terem aceitado o meu convite e pelas contribuições, que permitiram o enriquecimento da pesquisa.*

*Às pessoas que me auxiliaram na coleta dos dados: Ma. **Ingrid Tremel Barbato**, Dr. **Jorge Barbato Filho**, **Graciela Daros**, e membros das **APAES** do estado.*

*A todas as **mulheres**, que gentilmente cederam seu tempo e compartilharam um pouco da sua história de vida. A contribuição de vocês foi fundamental para a criação deste trabalho.*

*Às **famílias com X-frágil** que conheci, com suas **mães** fortes, guerreiras e que nunca desistiram dos sonhos e do bem-estar de seus filhos.*

*Às meninas do laboratório Neurogene, em especial à **Cinthia**, que me explicou as técnicas de PCR e me ajudou em algumas dúvidas que apareceram no meio do caminho.*

*À **UFSC**, pela oportunidade de ter feito este curso.*

*A todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial aqueles que marcaram minha graduação: **Paulo Hofmann**, **Margherita Barraco**, **Ademir Reis**, **Paulinho Simões** e **Edmundo Grisard**. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos, a graduação não teria sido a mesma sem vocês.*

*Aos grandes amigos que estavam torcendo por mim e mandando boas energias: **Fernanda, Letícia, Ana Carolina, Heloísa, Joice e Thiago**. Amizades que foram muito importantes para construir a pessoa que sou hoje.*

*À **Joey**, por ter revisado e corrigido meu Abstract. Valeu, **Joey!***

*Aos **colegas** de curso que me acompanharam ao longo destes cinco anos, na produção dos trabalhos, seminários e estudando para as provas.*

*Enfim, a **todos** que diretamente ou indiretamente colaboraram e torceram para que este trabalho fosse concretizado. Meus sinceros agradecimentos.*

*"Já ancorado na Antártida, ouvi ruídos que pareciam de fritura. Pensei: 'será que até aqui existem chineses fritando pastéis?' Eram cristais de água doce congelada, que faziam aquele som quando entravam em contato com a água salgada. O efeito visual era belíssimo. Pensei em fotografar, mas falei para mim mesmo: 'Calma, você terá muito tempo para isso...'. Nos 367 dias que se seguiram, o fenômeno não se repetiu. Algumas oportunidades são únicas."*

(Amyr Klink)

## RESUMO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a forma mais comum de deficiência intelectual herdada. Em 99% dos casos, ela é resultado da expansão (superior a 200 repetições) dos trinucleotídeos CGG (Citosina-Guanina-Guanina) no primeiro éxon, região 5' não-traduzida do gene *FMRI*, localizado no cromossomo X, região Xq27.3. Na população, o número de repetições CGG apresenta-se polimórfico, variando de 5 a mais de 200 repetições. Indivíduos que apresentam repetições CGG entre 55 e 200 são portadores da pré-mutação (PM), pois no processo de meiose, podem transmitir para a sua prole a mutação completa. A prevalência da PM é de um pré-mutado para cada 813 homens e uma pré-mutada para cada 259 mulheres. Além da chance de transmissão da SXF para a próxima geração, existem implicações clínicas que se manifestam em pré-mutados, como a FXTAS (Síndrome de Tremor e Ataxia Associada ao X-Frágil), principalmente em homens a partir de 50 anos ou mais e a FXPOI (Insuficiência Ovariana Primária Associada ao X-Frágil), em mulheres. Mulheres com PM também podem apresentar outras desordens, como tremor, fibromialgia, depressão e ansiedade. Este trabalho visa investigar as características de mulheres portadoras da PM da SXF, reforçar e delinear novos fenótipos que caracterizem este grupo, para que estas informações possam ser utilizadas futuramente em testes de triagem na população feminina antes do exame genético. Na pesquisa foram avaliados um grupo de mulheres portadoras da PM (n=77) e um grupo de controle (n=89), através da aplicação de um questionário com perguntas relativas à doenças ou problemas que estas mulheres apresentam ou apresentaram durante a vida. Diferiram entre os grupos, de modo significativo, as dores musculares (38.96% portadoras vs. 20.22% controle; *Odds Ratio* (OR) = 2.518,  $p= 0.008$ ), a dificuldade em matemática (44.16% portadoras vs. 29.21% controle; OR = 1.916,  $p= 0.046$ ) e a menopausa precoce (antes de 40 anos) (14.86 % portadoras vs. 0% controle; OR= 32.42,  $p= <0.001$ ). Foram citadas espontaneamente alterações hormonais em nível de ovários/útero, por 44.16% das portadoras da PM e 15.73% do controle. Estes fenótipos podem auxiliar na procura de portadoras da PM na população antes do exame genético, acrescentando ao que já é estabelecido na literatura, como casos de deficiência intelectual e autismo, casos de tremor/ataxia e FXPOI/menopausa precoce. Com base na literatura e com o que foi verificado no estudo, é proposto um questionário para ser utilizado nestas futuras pesquisas.

**Palavras-chaves:** Síndrome do X-Frágil. Pré-mutação. Fenótipos em portadoras.

## ABSTRACT

The Fragile-X Syndrome (FXS) is the most common form of inherited intellectual disability. In 99% of cases, it is the result of the expansion (up to 200 repetitions) of the trinucleotide CGG (cytosine-guanine-guanine) in the 5'UTR first exon of the FMR1 gene, located on chromosome X, region Xq27.3. In the population, the number of CGG repeats is shown as polymorphic, ranging from 5 to over 200 repetitions. Individuals who have CGG repeats between 55 and 200 are carriers of premutation, because during the process of meiosis they can transmit the full mutation to their offspring. The prevalence of the premutation is one for each 813 men and one for each 259 women. Besides the chance of transmission of FXS to the next generation, there are clinical implications that manifest in premutated individuals, such as FXTAS (Fragile X- Associated Tremor/Ataxia Syndrome), mainly men from the age of 50 or more and FXPOI (Fragile X- Associated Primary Ovarian Insufficiency), in women. Women with premutation may also have other disorders, such as tremor, fibromyalgia, depression and anxiety. This study aims to investigate the characteristics of women with the premutation of FXS, enhance and delineate new phenotypes that characterize this group, so that this information can be used in future screening tests in the female population, before the genetic test. In the present study, were investigated: a group of women with the premutation (n=77) and a group of control (n=89), by applying a questionnaire with questions regarding on diseases or problems that these women have now or had during their lives. Significant differences between groups were found for muscle pain (38.96% carriers vs. 20.22% controls; Odds Ratio (OR) = 2.518,  $p= 0.008$ ), the difficulty in math (44.16% carriers vs. 29.21% controls, OR = 1.916,  $p= 0.046$ ) and premature menopause (before 40 years) (14.86% carriers vs. 0% controls, OR = 32.42,  $p = <0.001$ ). Were cited the hormonal changes in level of ovaries/uterus as a spontaneous reports, for 44.16% of the carriers and 15.73% of controls. These phenotypes may help to identify carriers in the population that should be counsel to genetic test for FXS premutation, adding what is already established in the literature, for example, cases of intellectual disability and autism, ataxia/ tremor and FXPOI/premature menopause. Based on the literature and on the results of the present study, a questionnaire is proposed to be used in these future studies.

**Keywords:** Fragile X Syndrome. Premutation. Phenotypes in carriers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Presença do sítio frágil no cromossomo X (seta) em um cariótipo masculino.....	14
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do gene <i>FMRI</i> . .....	17
<b>Figura 3:</b> Técnica de <i>Enhanced</i> PCR, visualizada em gel de agarose.....	21
<b>Figura 4:</b> Genealogia hipotética, ilustrando o Paradoxo de Sherman. ....	23
<b>Figura 5:</b> Caracterização do grupo de portadoras da PM que fizeram o teste de PCR para FRAXA, separadas por idade e número de repetições CGG. ....	41
<b>Figura 6:</b> Comparação entre o grupo de portadoras e controle, com relação às enxaquecas/dores de cabeça intensas, dores musculares e dificuldades em matemática. .	45
<b>Figura 7:</b> Comparação entre o grupo de portadoras e controle, com relação à problemas ósseos, menopausa precoce, problemas de tireoide e hipertensão .....	46
<b>Figura 8:</b> Relação entre o número de repetições CGG e a idade de menopausa entre as portadoras da PM, em contraste com a distribuição de idades das portadoras da PM que ainda não entraram em menopausa. ....	47
<b>Figura 9:</b> Relação entre o número de repetições CGG e a idade em que se iniciaram os problemas de tireoide nas portadoras, em contraste com as portadoras que ainda não apresentaram problemas de tireoide.....	48
<b>Figura 10:</b> Frequência absoluta de citações espontâneas pelas portadoras da PM com relação às alterações hormonais em nível de ovário/útero. ....	49
<b>Figura 11:</b> Frequência absoluta de citações espontâneas pelos controles com relação às alterações hormonais em nível de ovários/útero. ....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Questionário para triagem de meninos, possíveis portadores da SXF. ....	16
<b>Tabela 2:</b> Classificação genotípica, conforme o número de repetições dos trinucleotídeos (CGG) <sub>n</sub> .....	18
<b>Tabela 3:</b> Como é estruturada a tabela de contingência 2x2 para o cálculo do OR. ....	38
<b>Tabela 4:</b> Caracterização demográfica do grupo de mulheres do estudo. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Descrição das doenças/desordens/aptidões nos grupos de mulheres, separadas por relato e diagnóstico. ....	42
<b>Tabela 6:</b> Comparação entre portadoras da PM (n=77) e controle (n=89), com relação à presença dos fenótipos. ....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA SXF.....	15
1.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA SXF.....	17
1.2.1 Classificação dos indivíduos conforme o número de repetições CGG.....	18
1.2.2 A proteína FMRP.....	19
1.2.3 Diagnóstico da SXF e da PM.....	20
1.3 RISCO DE TRANSMISSÃO DA SXF.....	22
1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS À PM.....	25
1.4.1 Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X-Frágil (FXTAS).....	25
1.4.2 Insuficiência Ovariana Primária Associada à Síndrome do X-Frágil (FXPOI).....	27
1.4.3 Disfunções na tireoide, fibromialgia, tremor e dormência nos membros.....	28
1.4.4 Depressão, ansiedade e problemas emocionais.....	30
1.4.5 Dificuldades na matemática.....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 ASPECTOS GERAIS.....	34
4.2 GRUPO AMOSTRAL.....	34
4.2.1 Portadoras da PM identificadas pelo teste de PCR para FRAXA.....	34
4.2.2 Portadoras da PM que não fizeram o teste de PCR para FRAXA.....	34
4.2.3 Controles identificados pelo teste de PCR para FRAXA.....	35
4.2.4 Controles que não fizeram o teste de PCR para FRAXA.....	35
4.3 AUTORIZAÇÃO PARA A PESQUISA.....	35
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS REPETIÇÕES CGG NO GENE <i>FMR1</i> .....	36
4.5 QUESTIONÁRIO.....	36
4.6 LOCAL DA PESQUISA.....	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>

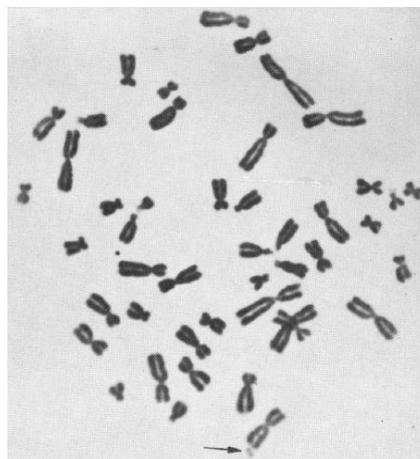
5.1 ELABORAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E ENTREVISTAS .....	39
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE MULHERES.....	39
5.3 DOENÇAS/DESORDENS NAS MULHERES ENTREVISTADAS.....	41
5.3.1 Autopercebidos .....	45
5.3.2 Diagnosticados.....	46
5.3.3 Menopausa em portadoras da PM.....	47
5.3.4 Problemas de tireoide em portadoras da PM .....	48
5.3.5 Outros problemas citados pelas portadoras da PM espontaneamente .....	49
5.3.6 Outros problemas citados pelo grupo controle espontaneamente.....	50
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>69</b>
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	69
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO INICIAL .....	71
APÊNDICE C- QUESTIONÁRIO FINAL.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM 300624) é uma síndrome ligada ao cromossomo X, considerada a forma mais comum de deficiência intelectual (DI) herdada e a segunda causa mais frequente de DI com origem genética, superada apenas pela síndrome de Down (MURRAY et al., 1997). Atualmente ela é apontada também como a principal causa genética do autismo (ABRAMS et al., 2012; HUNTER et al., 2012).

Sua descoberta ocorreu em meados da década de 1940 por dois pesquisadores: James Purdon Martin e Julia Bell, através da investigação da genealogia de uma família com DI ligada ao cromossomo X. Por esta razão, ficou conhecida por muitos anos pelo nome síndrome de Martin-Bell (MURRAY et al., 1997).

Em 1969, Herbert Lubs, utilizando técnicas citogenéticas, identificou em quatro membros masculinos de uma família com DI, a presença de uma incomum constrição na extremidade distal do braço longo do cromossomo X (sítio frágil), que foi denominada pelo autor de “cromossomo X marcador” (LUBS, 1969) (**Figura 1**).



**Figura 1:** Presença do sítio frágil no cromossomo X (seta) em um cariótipo masculino.  
Fonte: Lubs (1969).

Em 1991, Verkek e colaboradores verificaram que o sítio frágil em questão se localizava mais especificamente na região Xq27.3, no gene *FMR1* (*Fragile Mental Retardation 1*) e que correspondia a uma “mutação dinâmica” por expansão dos trinucleotídeos CGG (Citosina-Guanina-Guanina). Este sítio frágil atualmente é conhecido

por FRAXA (*Fragile site, X chromosome, A sit*) (VERKERK et al., 1991; JIN & WARREN, 2000).

A prevalência da SXF é estimada em um afetado para cada 4000 homens e por inferência, uma afetada para cada 8000 mulheres na população europeia (TURNER et al., 1996), embora recentemente estimou-se uma prevalência mais alta da SXF em uma população espanhola: um afetado para cada 2600 homens (FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009b). O fato de a SXF ser menos frequente no sexo feminino pode ser explicado pelo fenômeno de inativação do cromossomo X que ocorre nas fêmeas de mamíferos, que pode, aleatoriamente, inativar o cromossomo X que tem a mutação (WILLEMSSEN et al., 2011). Além da alteração genética e do comprometimento cognitivo, um afetado pela SXF apresenta um quadro clínico que pode englobar características físicas e comportamentais (MURRAY et al., 1997).

### 1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA SXF

Entre os afetados estão presentes características em graus variáveis, sendo que a maioria delas é sutil no período da infância, o que pode dificultar o diagnóstico clínico. Dentre as características clínicas, podem estar presentes: face alongada e estreita, prognatismo, orelhas grandes e em abano, palato alto, macrocefalia, hipoplasia da cartilagem auricular, hiperextensibilidade articular, pele elástica (aveludada), prega palmar única, prolapso da válvula mitral e dilatação do arco aórtico. A macroorquídia (aumento dos testículos) está presente em aproximadamente 80% dos homens adultos afetados. Indivíduos com SXF também podem apresentar estrabismo, otites recorrentes, escoliose e hipotonia (HAGERMAN & HAGERMAN, 2002; MCCONKIE-ROSELL et al., 2005; HAGERMAN et al., 2008).

A DI é a característica cognitiva mais marcante da SXF. Ela pode variar de leve, moderada à grave (RODRIGUEIRO, 2006). Em geral, neste aspecto, os homens com SXF tendem a ser moderadamente ou gravemente afetados (NOLIN et al., 2003), enquanto que as mulheres têm DI leve.

É comum também observar nos indivíduos com a SXF o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e convulsões (HAGERMAN & HAGERMAN, 2002; ABRAMS et al., 2012).

Alterações comportamentais em portadores da SXF incluem transtornos do espectro do autismo, como: abanar ou morder as mãos, alterações de humor, falta de empatia e pobre contato ocular. Aproximadamente 30% das crianças com SXF têm autismo. Os portadores da síndrome também podem apresentar ansiedade, timidez, fobia social e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (MCCONKIE-ROSELL et al., 2005; HAGERMAN et al., 2008). No entanto, apesar de existirem características clínicas bem marcantes, existe grande variabilidade na apresentação das mesmas pelos portadores, o que pode dificultar o seu diagnóstico clínico (RECASENS et al., 1996).

Um importante aliado para a seleção de possíveis portadores da SXF, antes da realização do exame genético, são questionários de triagem, baseados em características presentes nos afetados (CHRISTOFOLINI et al., 2007). Butler e colaboradores desenvolveram em 1991 um questionário validado e que hoje é utilizado quando se suspeita que o indivíduo seja portador da SXF. O questionário é composto por 15 itens (**Tabela 1**), que são pontuados da seguinte maneira: 0 pontos- nunca teve a característica; 1 ponto- já apresentou; 2 pontos- apresenta atualmente. Para meninos, a suspeita de que seja afetado pela SXF ocorre quando a pontuação final do questionário fica entre 12 a 30 pontos.

**Tabela 1:** Questionário para triagem de meninos, possíveis portadores da SXF.

---

A: Deficiência intelectual ou dificuldade de aprendizagem grave
B: Orelhas em abano ou grandes, ou pequenas em relação à cabeça
C: Testículos grandes ou já teve algum problema em relação aos testículos no nascimento
D: Distúrbio de atenção importante (TDA)
E: Hiperatividade
F: História familiar com deficiência intelectual, ou autismo ou dificuldade de aprendizagem
G: Resistência ao toque
H: Hiperextensibilidade das articulações dos dedos
I: Fala perseverante, repetitiva ou imitativa
J: Batem as mãos em forma de pássaros, principalmente quando excitados
K: Calosidades (devido ao ato de morder das mãos, se automutila)
L: Pobre contato ao olhar (não encaram as pessoas devido à insegurança ou vergonha)
M: Palma de uma ou das duas mãos com prega única
N: Prega plantar única
O: Olhos azuis claros ( <i>pale blue eyes</i> )*

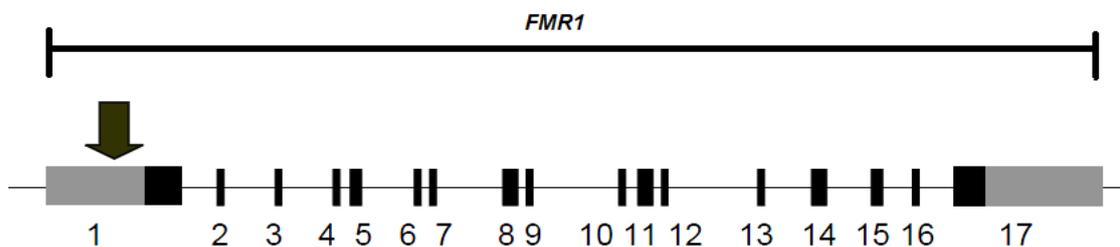
---

Fonte: Adaptado de Butler e colaboradores (1991).

\*Não é uma característica da SXF, mas foi associada à síndrome porque os primeiros pacientes diagnosticados eram de origem europeia (CHRISTOFOLINI et al., 2007).

## 1.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA SXF

Em 1991, foi realizada a caracterização molecular da mutação que resulta na SXF (VERKERK et al., 1991). Identificou-se que entre os afetados não havia a expressão de um gene, conhecido por *FMRI* (WILLEMSSEN et al., 2011). Este gene tem ~39 Kilobases (Kb) de comprimento, 17 éxons e está localizado no braço longo do cromossomo X, região Xq27.3 (MURRAY et al., 1997) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Representação esquemática do gene *FMRI*. Os retângulos escuros são os 17 éxons; os retângulos cinzas são as regiões 5' e 3' não-traduzidas e a seta indica a localização das repetições CGG. Fonte: Rodrigueiro (2006).

Em praticamente 99% dos casos, o silenciamento deste gene é resultado da expansão no número dos trinucleotídeos CGG no primeiro éxon, região 5' UTR (não-traduzida) de *FMRI* (NUSSBAUM et al., 2008; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009). Esta expansão, que nos afetados é superior a 200 repetições, resulta em hipermetilação da ilha CpG (sequências reguladoras), adjacente às repetições CGG, no promotor do gene *FMRI* (SNOW et al., 1993; RECASENS et al. 1996; JOHNSTON et al., 2001; NUSSBAUM et al., 2008). A metilação destas regiões suprime o processo de transcrição do gene *FMRI*, acarretando na ausência ou redução da proteína FMRP (ABRAMS et al., 2012). Em aproximadamente 1% dos casos de SXF, o número de repetições não está alterado e a síndrome é causada por deleções ou mutações pontuais no gene (TURNER et al., 1996).

Podem ser observados mosaicos entre os portadores da SXF, que seriam indivíduos que apresentam mais de uma linhagem celular com composição genética distinta (MURRAY et al., 1997). O mosaicismo pode estar relacionado ao tamanho da repetição (expansão) ou ao status de metilação (GARBER et al., 2008). No primeiro caso, os portadores da SXF possuem em determinadas células o número de repetições CGG superior a 200 e, em outras, o número de repetições inferior a 200. No segundo caso, mais raro, eles têm uma mutação completa em todas as células, porém em algumas, o gene não está metilado, por razões desconhecidas.

Indivíduos mosaicos geralmente têm um grau de DI mais leve do que aqueles que não são mosaicos ou mesmo não apresentam DI, devido à presença de baixas quantidades da proteína FMRP (NUSSBAUM et al., 2008). Estima-se entre os indivíduos com SXF uma prevalência entre 18% a 40% de mosaicos, somando-se os dois casos (expansão e metilação) (HAGERMAN & HAGERMAN, 2002; MCCONKIE-ROSELL et al., 2005).

### 1.2.1 Classificação dos indivíduos conforme o número de repetições CGG

O número de repetições dos trinucleotídeos CGG do gene *FMRI* apresenta-se polimórfico na população, sendo a SXF caracterizada como uma desordem na expansão da repetição destes trinucleotídeos, superior a 200 trincas CGG (mutação completa), um tipo de mutação instável (VERKERK et al., 1991). Segundo o *American College of Medical Genetics* (ACMG, 2006), a classificação conforme o número de repetições CGG se encontra na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Classificação genotípica, conforme o número de repetições dos trinucleotídeos (CGG)<sub>n</sub> do gene *FMRI*, segundo classificação do ACMG.

Genótipo	Número de Repetições (CGG) <sub>n</sub>
Normal	$5 \leq n \leq 44$
Zona Intermediária (Zona <i>Gray</i> )	$45 \leq n \leq 54$
Pré-Mutação (PM)	$55 \leq n \leq 200$
Mutação Completa	$n > 200$

Fonte: ACMG (2006).

Os alelos (=variações do gene *FMRI*) com frequências mais comuns em estudos populacionais, geralmente são de 30 e 29 repetições CGG (FU et al., 1991; SNOW et al., 1993; RECASENS et al., 1996; FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009b). Para o estado de Santa Catarina, as frequências alélicas mais comuns foram estimadas em 28 e 30 repetições CGG (QUEIROZ, 2006).

A distinção entre alelos de zona *gray* e alelos com pré-mutação (PM) é empírica e depende da análise do histórico familiar e a instabilidade das repetições (NOLIN et al., 2003). Os alelos com PM são conhecidos por serem instáveis e podem ser expandidos no processo da meiose para a mutação completa (FU et al., 1991). Para os alelos em zona *gray* subsequentes gerações correm risco de receberem o alelo com a PM (NOLIN et al., 2003).

A prevalência da PM na população é estimada em um pré-mutado para cada 813 homens e uma pré-mutada para cada 259 mulheres (ROUSSEAU et al., 1995; DOMBROWSKI et al., 2002), embora hajam estudos que mostram prevalências mais altas entre as mulheres, como uma pré-mutada para cada 151 mulheres americanas (SELTZER et al., 2012) ou uma pré-mutada para cada 113 mulheres israelitas (TOLEDANO-ALHADEF et al., 2001). Para alelos em zona *gray* as prevalências estimadas são elevadas: um alelo zona *gray* em cada 35 mulheres e um em cada 42 homens (SELTZER et al., 2012).

### 1.2.2 A proteína FMRP

O RNA mensageiro (mRNA) de *FMR1* é um transcrito da ordem de aproximadamente 4Kb. A partir deste mRNA é produzida a proteína FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein 1*) (JIN & WARREN, 2000; WILLEMSSEN et al., 2011). Podem ser produzidas diferentes isoformas da proteína FRMP, devido ao processamento alternativo (*splicing*), que ocorre nos éxons 12, 14, 15 e 17 do mRNA *FMR1* (WILLEMSSEN et al., 2011).

FMRP é uma proteína citoplasmática expressa em altas quantidades no cérebro, nos testículos, ovários, timo, esôfago e baço. Na placenta, nos pulmões, nos rins, na tireoide, no intestino e no útero ela também é expressa, porém em menores quantidades (HINDS et al., 1993). FMRP possui diferentes domínios, como o domínio KH, que a caracteriza como uma proteína que se liga a mRNAs, além de um sinal de localização nuclear (NLS) e outro de exportação nuclear (NES), indicando que ela realiza trânsito entre o núcleo e o citoplasma da célula (WILLEMSSEN et al., 2011). Além da capacidade de poder se ligar a determinados tipos de mRNAs, FMRP também pode regular o processo de síntese proteica, através de modulação (supressão ou ativação) da tradução de mRNAs-alvo (HAGERMAN et al., 2008), especialmente nos dendritos dos neurônios no momento das sinapses (GARBER et al., 2008; WILLEMSSEN et al., 2011). Outra função de FMRP recentemente observada em estudos é a capacidade da proteína de interagir com componentes do complexo RISC (*RNA Induced Silence Complex*), atuando na via de microRNAs (=miRNAs), reprimindo o processo de tradução de mRNAs-alvo (WILLEMSSEN et al., 2011). Ainda não se conhecem todas as proteínas que dependem da interação de FMRP para serem traduzidas, mas sabe-se que FMRP tem um importante papel na plasticidade sináptica, memória e aprendizado (JIN & WARREN, 2000; GARBER et al., 2008).

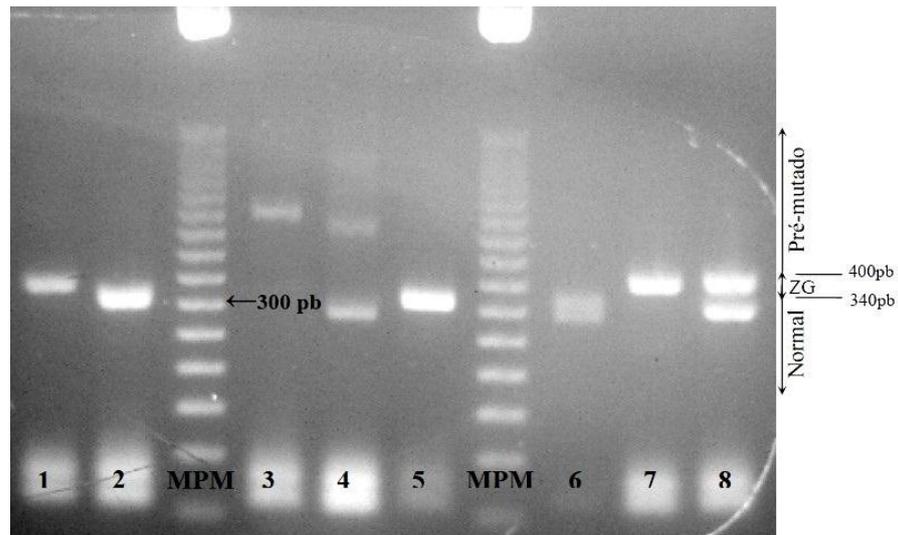
### 1.2.3 Diagnóstico da SXF e da PM

O uso de técnicas citogenéticas (cariótipo) para a detecção da SXF torna o processo de identificação limitante, pois nem todas as células de um indivíduo com SXF expressarão o sítio frágil, o que pode gerar um resultado falso negativo. De acordo com o trabalho de Lubs (1969), a presença deste marcador citogenético ocorreu entre os quatro homens com SXF avaliados, em uma proporção de 1% a 30% das células. No estudo de Recasens e colaboradores (1996), foi estimado que somente 20% das mulheres com SXF apresentam este marcador. Outro fator limitante desta técnica é a impossibilidade de se identificar portadores da PM ou da zona *gray*.

As ferramentas de biologia molecular são atualmente as mais recomendadas para o diagnóstico de SXF e da PM. Entre elas estão a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e o *Southern Blotting* (ABRAMS et al., 2012).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação de um gene específico ou de uma região do DNA. Após a técnica de eletroforese, o produto da reação de PCR para a SXF, demonstrará um tamanho (banda) que será correspondente ao número de repetições presentes no gene *FMRI* (QUEIROZ, 2006). A eficiência da PCR é inversamente proporcional ao número de repetições CGG que o indivíduo apresenta e pode dificultar a identificação daqueles com a mutação completa, ou mesmo pré-mutados com alto número de repetições (acima de 100 CGG), devido ao fato de que regiões ricas em CG tendem a formar estruturas secundárias, resultando em baixa amplificação (RECASENS et al., 1996; FRACKMAN et al., 1998). Podem ser utilizados alguns aditivos na PCR para estabilizar o DNA e amenizar este problema, como o dimetil sulfóxido (DMSO), a N-N-N-trimetilglicina (betaína), formamida, glicerol, entre outros (FRACKMAN et al., 1998).

Em 2005, foi proposta uma técnica de PCR, denominada *Enhanced PCR*, em que se utiliza a betaína como agente. É eficiente na identificação de homens com até 330 repetições CGG e mulheres com até 160 repetições CGG e visualização em gel de agarose (SALUTO et al., 2005) (**Figura 3**).



**Figura 3:** Técnica de *Enhanced PCR*, visualizada em gel de agarose. Nas raias 1 e 2, encontram-se homens, classificados como normais; nas raias 3 e 4, homem e mulher pré-mutados, respectivamente; raia 5, mulher com resultado inconclusivo; na raia 6, mulher normal; na raia 7, homem zona *gray*; raia 8, mulher zona *gray*. MPM: Marcador de Peso Molecular; ZG: Zona *Gray*; pb: pares de base. Segundo referências do autor, os alelos zona *gray* têm entre 40 a 60 repetições CGG. Fonte: Queiroz (2006).

Na análise com *Southern Blotting*, o DNA do indivíduo é extraído das células e submetido à digestão por enzimas de restrição (como *EcoRI*, por exemplo), que realizam cortes em ambos os lados da fita de DNA, na região das trincas CGG. Geralmente utiliza-se uma segunda enzima, que é sensível à metilação (como *EagI*, por exemplo), que vai clivar a ilha CpG apenas dos indivíduos que não têm o gene metilado, possibilitando assim, distinguir alelos metilados de não metilados, pelo padrão de fragmentos gerados (MCCONKIE-ROSELL et al., 2005). As bandas, com as repetições CGG do gene *FMRI* são visualizadas através do uso de uma sonda radioativa (NUSSBAUM et al., 2008). Uma das sondas mais comuns utilizadas na detecção da SXF é a StB12.3 (MURRAY et al., 1997) (HAGERMAN & HAGERMAN, 2002). Esta é uma das grandes vantagens no uso do *Southern Blotting*: a confiabilidade na detecção de altas repetições e a detecção do status de metilação da ilha CpG, sendo portanto, a mais recomendada para a detecção da SXF. Por outro lado, a técnica de PCR é mais rápida e geralmente mais barata, necessitando de pequenas quantidades de DNA e com boa resolução para alelos normais, zona *gray* e com pré-mutação na faixa baixa-média (inferior a 100 repetições) (HAGERMAN & HAGERMAN, 2002). Para a detecção de mutações pontuais ou deleções em *FMRI*, o sequenciamento é a técnica mais recomendada (MCCONKIE-ROSELL et al., 2005).

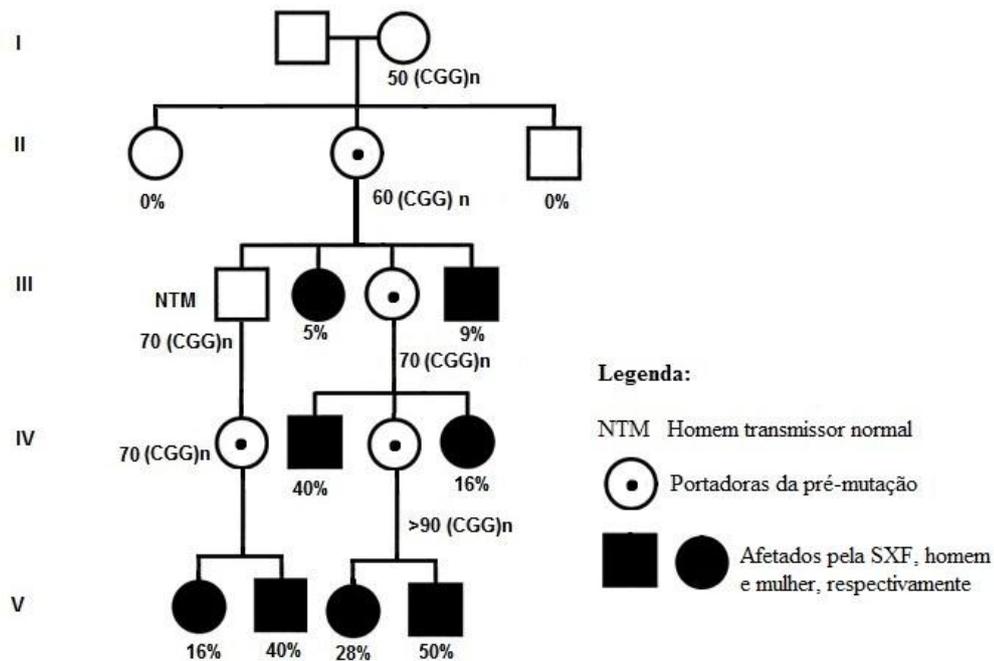
### 1.3 RISCO DE TRANSMISSÃO DA SXF

O risco de expansão de PM para mutação completa varia conforme o gênero do parente portador da PM e o tamanho da repetição presente no gene *FMRI* (ABRAMS et al., 2012). Homens com PM ou mutação completa não transmitem seus alelos aos filhos homens, pois seus filhos herdam o cromossomo Y. Em contraste, todas as suas filhas receberão o alelo paterno. No processo de transmissão, sabe-se que o alelo que vem do pai e que passa para a filha pode ser expandido em relação ao número de repetições, ser reduzido ou permanecer inalterado (SNOW et al., 1993), porém, geralmente a variação no número de repetições entre pai e filha é pequena ou nem ocorre (MCMURRAY, 2010). Devido a isto, homens que carregam a PM são considerados homens transmissores normais ou NTM (*Normal Transmitting Males*) (MURRAY et al., 1997).

Uma curiosa observação foi feita por Reyneirs e colaboradores em 1993, com relação à transmissão por afetados: os gametas (espermatogônias) de homens com SXF apresentam apenas a PM no genoma, ao invés da mutação completa, indicando que existe um processo de seleção que impede a transmissão de mutação completa diretamente de pai para filha. Recentemente foi observado que nas espermatogônias de fetos com mutação completa, as repetições CGG passam pelo processo de redução, de mutação completa para PM durante o desenvolvimento embrionário, entre a 13<sup>a</sup> e a 17<sup>a</sup> semana (MCMURRAY, 2010). Desta forma, tanto o portador da PM quanto um portador da SXF transmitem para as filhas apenas a PM (ABRAMS et al., 2012). Já as mães com PM ou com mutação completa heterozigotas (que têm um cromossomo X com a PM ou mutação completa e o outro cromossomo X normal) podem transmitir com 50% de chances um alelo pré-mutado ou com mutação completa para um filho ou filha, cujo alelo também pode ser contraído ou expandido, em relação às repetições CGG. Uma mãe com mutação completa terá 100% de chances de ter também um filho ou filha com mutação completa, caso mande o cromossomo X com o gene expandido. Para as mães com PM, dependendo do tamanho do alelo, este pode ser expandido e com isso, seus filhos poderão apresentar a mutação completa (NOLIN et al., 2003). Acredita-se que a expansão no número de repetições ocorra durante a meiose do oócito, na prófase I (MCMURRAY, 2010).

Assumindo o modo de transmissão da PM para a mutação completa com origem materna, implica dizer que todas as mães de crianças com SXF por expansão CGG, têm mutação completa ou são portadoras da PM (MCCONKIE-ROSELL et al., 2005).

Estudos da década de 1980, baseados na análise da transmissão da SXF em famílias intrigavam os pesquisadores, pois era observado que as mães de NTMs, apresentavam um percentual menor de filhos afetados pela SXF, do que as filhas destes homens. Esse fenômeno recebeu o nome de “Paradoxo de Sherman”, em homenagem a pesquisadora responsável pela sua elucidação (SHERMAN et al., 1985). De acordo com este paradoxo, a probabilidade de DI aumenta através do número de gerações por onde a mutação é transmitida (RODRIGUEIRO, 2006) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Genealogia hipotética, ilustrando o Paradoxo de Sherman. Neste herodograma percebe-se um aumento na probabilidade de deficiência intelectual, conforme se sucedem as gerações. As porcentagens refletem as chances de se ter um filho afetado pela SXF. Fonte: Adaptado de Fu e colaboradores (1991).

Para entender melhor o motivo pelo qual as gerações mais novas apresentavam maiores chances de DI, aliou-se o estudo das genealogias aos estudos moleculares. Com isto, permitiu-se concluir que, quanto maior o número de repetições CGG entre as mulheres com PM, mais altas eram as chances de mutação completa na geração seguinte. Mães com

repetições CGG iguais ou superiores a 90 têm, em média, 100% de chances de terem filhos homens com SXF, caso transmitam o cromossomo que tem o gene alterado para o filho (YRIGOLLEN et al., 2012). Embora na faixa de pré-mutação mais baixa (55-59 repetições) a frequência de transmissão da mutação completa seja reduzida, é possível ser observada a expansão. Fernandez-Carvajal e colaboradores (2009a) verificaram a transmissão da mutação completa em um menino com SXF (538 repetições CGG), cuja mãe era portadora da PM (56 repetições CGG) e que havia recebido este gene alterado do seu pai (avô do menino), que tinha 52 repetições CGG, classificado então, como zona *gray*.

Em pessoas com alelos entre 5 a 54 repetições, existem interrupções AGG (Adenina-Guanina-Guanina) entre as repetições CGG, geralmente uma interrupção a cada 10 ou 20 conjuntos de trinucleotídeos CGG (NOLIN et al., 2003). Acredita-se que estas interrupções conferem estabilidade para o gene *FMRI* (ABRAMS et al., 2012). Pode ser constatado que em geral, nos alelos com PM ocorre a perda destas interrupções ou a presença de apenas uma interrupção, como foi observada por Fernandez-Carvajal e colaboradores (2009a) na transmissão da SXF do avô zona *gray* até o menino afetado, citados anteriormente, em que o avô tinha duas interrupções AGG no gene *FMRI* e a mãe, com PM, não tinha nenhuma.

Yrigollen e colaboradores (2012), através da análise das interrupções AGG em 267 portadoras da PM e a porcentagem de transmissão da PM para a mutação completa na prole, corroboraram os dados de que as interrupções AGG conferem estabilidade ao gene *FMRI*. Em outras palavras, utilizando um exemplo citado pelo autor e seus colaboradores: uma mulher com 75 repetições CGG e sem interrupções AGG teria um risco de aproximadamente 77% de transmitir a mutação completa, enquanto que, uma que tenha o mesmo número de repetições CGG, mas que possua duas interrupções AGG apresentaria um risco de transmissão de apenas 12% (YRIGOLLEN et al., 2012).

Uma das teorias que poderia explicar a expansão das repetições CGG é baseada no modelo de replicação do DNA. De acordo com este modelo, a DNA polimerase, no processo de replicação, principalmente dos fragmentos de Okazaki, às vezes se desconecta e, para se religar, uma das suas funções é reencontrar o local de continuidade de polimerização, pareando o segmento recém-sintetizado com a fita molde. Se na fita molde há muitas repetições semelhantes (CGG), ela pode se religar antes e replicar a parte já replicada. E isto repetidamente. Os AGG mudam a sequência, e este é um dos mecanismos que a enzima

utiliza para reconhecer diferenças na sequência e a probabilidade de pareamento errôneo para continuar a replicação se minimiza (JIN & WARREN, 2000).

Além da perda das interrupções AGG e erros na replicação, têm se sugerido que erros causados por enzimas de reparo de DNA contribuem para a capacidade de expansão da PM para a mutação completa na geração seguinte (MCMURRAY, 2010; YRIGOLLEN et al., 2012).

## 1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS À PM

### 1.4.1 Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X-Frágil (FXTAS)

Portadores da PM podem desenvolver após os 50 anos, uma desordem neurodegenerativa conhecida por Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X-Frágil (FXTAS: *Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*) (OMIM 300623) (HAGERMAN & HAGERMAN, 2008). Embora seja altamente relacionada à PM, também foi reportada a sua presença em um homem com alelo em zona *gray* (52 repetições CGG) (FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009a) e, recentemente, Liu e colaboradores (2012) descreveram dois casos de FXTAS em pessoas com alelos na faixa de zona *gray*: um homem e uma mulher. Ambos tinham histórico familiar de FXTAS em parentes pré-mutados.

Esta síndrome acomete de 40% a 60% dos homens pré-mutados e entre 8% a 16% das mulheres pré-mutadas, sendo que as chances se elevam com a idade do portador da PM e também têm relação com o número de repetições que o portador da PM apresenta (HESSL et al., 2005; COFFEY et al., 2008; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009; LEEHEY et al., 2010; HUNTER et al., 2012). A incidência mais baixa da FXTAS entre as mulheres pode ser explicada pelo efeito protetor do segundo cromossomo X que não tem a PM (WILLEMSSEN et al., 2011).

Indícios da FXTAS envolvem o aparecimento de duas características clínicas: primeiramente o tremor, seguido da ataxia, alguns anos após o início do tremor (TASSONE & HAGERMAN, 2012). Devido à ataxia, os indivíduos podem sofrer constantes quedas (LEEHEY et al., 2010). Outros sintomas relacionados que ocorrem após o tremor e a ataxia são: neuropatia periférica, problemas de memória, ansiedade, depressão, irritabilidade, incontinência urinária e fecal (LEEHEY et al., 2010), embora a neuropatia e a dormência nos

membros já tenham sido observadas antes do aparecimento do tremor (TASSONE & HAGERMAN, 2012).

A incidência da FXTAS é alta em pré-mutados, não sendo significativa em indivíduos normais ou com mutação completa (HAGERMAN & HAGERMAN, 2008), sendo que as manifestações clínicas iniciais e a sobrevida são inversamente relacionadas ao tamanho da repetição: quanto maior o tamanho das repetições CGG, mais cedo aparecem os sintomas e mais cedo o indivíduo tende a falecer. O diagnóstico desta síndrome baseia-se em achados clínicos, radiológicos (ressonância magnética) e neuropatológicos (WILLEMSSEN et al., 2011; TASSONE & HAGERMAN, 2012).

Em pré-mutados se processa a transcrição do gene *FMRI*, porém os níveis de mRNA (especialmente entre portadores com número de repetições CGG superiores a 100), podem ser até oito vezes mais elevados do que em indivíduos sem a PM e a quantidade de proteína produzida é baixa, indicando que ocorrem defeitos na tradução. Por haver baixa tradução de FMRP, acredita-se que o excesso de mRNA produzido represente um mecanismo compensatório (TASSONE & HAGERMAN, 2012).

Uma evidência clínica na FXTAS é a presença de inclusões intranucleares nos neurônios e astrócitos, devido ao excesso de mRNA *FMRI* (GRECO et al., 2002). Atualmente tem se estudado as causas destas inclusões e uma das hipóteses mais embasadas para a sua origem reside no próprio mRNA *FMRI* de pré-mutados. Segundo a hipótese, as inclusões são formadas porque a repetição CGG do mRNA *FMRI*, por ser longa, “sequestra” proteínas, sobretudo fatores responsáveis pela regulação do processamento alternativo de outras proteínas (exemplo: o “sequestro” do fator Sam68), causando alteração no funcionamento normal da célula (SELLIER et al., 2010). Um fato observado por Sellier e colaboradores (2010) foi que o “sequestro” de Sam68 foi alterado quando utilizou-se a tautomicina, o que poderá representar futuramente uma das vias de tratamento para a FXTAS.

Nas inclusões, já foram identificadas proteínas, como Alfa  $\beta$ -cristalina e lamina A/C. A presença de inclusões com lamina A/C também aparece em outra desordem: Charcot-Marie-Tooth tipo 2, uma doença autossômica recessiva, que tem como sintoma a neuropatia periférica, quadro clínico presente na FXTAS. Possivelmente, a alteração da distribuição da lamina A/C seja a uma das responsáveis pela neuropatia da FXTAS (AROCENA et al., 2005). Outras proteínas identificadas que são “sequestradas” pelas repetições CGG, incluem hnRNP A2 e o complexo Drosha/DGCR, cuja função deste último é a transformação de pri-miRNAs

para pré-miRNAs, uma via importante para a formação de miRNAs, que são reguladores gênicos (TASSONE & HAGERMAN, 2012).

Além das inclusões, achados clínicos observados em exames *post mortem* de homens pré-mutados com FXTAS, indicaram a atrofia cerebral e de outras estruturas do sistema nervoso (GRECO et al., 2002).

#### 1.4.2 Insuficiência Ovariana Primária Associada à Síndrome do X-Frágil (FXPOI)

A Insuficiência Ovariana Primária associada à Síndrome do X-Frágil (FXPOI: *Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency*) (OMIM 311360) é caracterizada por amenorreia (ausência de menstruação) por um período de pelo menos quatro meses e dois níveis hormonais de FSH acima de 40 UI/l, ambas as condições relacionadas com a redução da reserva ovariana (SPATH et al., 2011).

Por muito tempo, FXPOI e FOP (falência ovariana prematura ou menopausa precoce), foram tratados como sinônimos, no entanto, a FOP é apenas o fenótipo mais grave da FXPOI, caracterizado pelo cessar da menstruação antes dos 40 anos de idade, enquanto que a FXPOI, inclui um espectro de desordens, como, ciclos menstruais irregulares, alterações hormonais e infertilidade, culminando então, com a menopausa precoce (SPATH et al., 2011). Aproximadamente 1% das mulheres têm menopausa precoce. Entre mulheres pré-mutadas, esta taxa varia em 14-20% (ALLINGHAM-HAWKINS et al., 1999; VIANNA-MORGANTE et al., 1999; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009). Para as mulheres que têm menopausa precoce, estima-se que 5% sejam pré-mutadas (BENNETT et al., 2010). Além disso, mesmo entrando em menopausa após os 40 anos, as portadoras da PM tendem a entrar em menopausa, em média, cinco anos mais cedo (entre 40-45 anos) do que mulheres não portadoras, uma condição definida pela literatura americana como menopausa cedo (*early menopause*) (SULLIVAN et al., 2005; WILLEMSSEN et al., 2011).

Assim como na FXTAS, mulheres com FXPOI produzem elevadas quantidades de mRNA *FMRI*. Uma possível explicação para o desenvolvimento da FXPOI pode ser a de que, assim como na FXTAS, ocorra o efeito de toxicidade, devido ao acúmulo de mRNA *FMRI* nas células ovarianas (células da granulosa e oócito), levando de forma mais rápida à atresia folicular (SULLIVAN et al., 2005; WILLEMSSEN et al., 2011). Outro fator que contribuiria para a FXPOI seria a alteração na função endócrina que ocorre em nível de hipotálamo e

hipófise, também relacionadas ao efeito tóxico produzido pelo mRNA *FMRI* (LEEHEY et al., 2010).

A prevalência da menopausa precoce parece estar relacionada com o número de repetições CGG. Ela é mais alta entre mulheres com alelos na faixa intermediária (entre 80-100 repetições), do que entre aquelas com baixas repetições (59-79) ou altas repetições (superiores a 100). Sullivan e colaboradores (2005) verificaram a incidência desta desordem em 18.6% das mulheres com alelos na faixa intermediária enquanto que, entre aquelas com baixas repetições e altas repetições, os índices foram de 5.9% e 12.5%, respectivamente. Segundo Allen e colaboradores (2007), existem duas hipóteses que podem explicar a alta ocorrência da menopausa precoce entre mulheres com alelos na faixa intermediária: a primeira seria de que ela tem início durante o desenvolvimento pré-natal, no *pool* de oócitos, provocando redução do número de gametas. A redução do número de oócitos seria explicada porque neste estágio de desenvolvimento existe alta expressão da proteína FMRP nas células germinativas e que alelos com repetições entre 80-100 CGG seriam os que permitiriam maior produção de FMRP. Partindo do pressuposto de ação de FMRP como supressor da tradução, o excesso de FMRP promoveria haploinsuficiência na produção de proteínas importantes para o desenvolvimento dos oócitos, por inibi-las. A segunda hipótese é de que os alelos na faixa intermediária permitem maior acúmulo de mRNA *FMRI* nos folículos, agravando o efeito da toxicidade. Estes últimos autores reforçaram os estudos de Sullivan e colaboradores (2005), demonstrando que mulheres na faixa intermediária de repetições apresentavam maior prevalência de menopausa precoce, além de ciclos menstruais irregulares e curtos (inferiores à 27 dias), comparando às mulheres com repetições CGG nas faixas mais altas ou mais baixas (ALLEN et al., 2007). No entanto, em recente estudo com 366 mulheres, a teoria de que a maior incidência de menopausa precoce ocorre naquelas com repetições na faixa intermediária não foi corroborada, aparentando não haver relação com as repetições (BENNETT et al., 2010).

### **1.4.3 Disfunções na tireoide, fibromialgia, tremor e dormência nos membros**

Além das desordens bem identificadas em pré-mutadas (FXTAS e FXPOI), um estudo de 2008 apontou que as portadoras da PM podem apresentar de modo mais frequente que o grupo controle da população, dores musculares (25.6%), histórico de tremores (11.7%) e

dormência nas extremidades dos membros (45.2%), dados observados em um grupo de 128 mulheres portadoras da PM, por Coffey e colaboradores (2008). Para 19 portadoras da PM e com provável FXTAS, os autores observaram alta frequência de problemas de tireoide, especialmente hipotireoidismo (50%), hipertensão (61.1%), convulsões (22.2%), neuropatia periférica (52.9%), fibromialgia (43.8%) e dores musculares (76.5%) (COFFEY et al., 2008).

Rodriguez-Revenga e colaboradores (2009) analisaram 280 mulheres com PM, e verificaram entre as portadoras da PM, problemas de tireoide, com 15.9% de frequência. A dor muscular crônica apareceu como resultado significativo, com 24.4% de frequência, taxa mais elevada do que é encontrada na população em geral, de 2-10%. Foi observado que os problemas autoimunes ocorreram em elevada frequência entre 344 portadoras da PM no trabalho de Winarni e colaboradores (2012), sendo mais frequentes os problemas de tireoide (24.4%), a fibromialgia (10.2%) e síndrome do intestino irritável (9.9%). O estudo também sugere que doenças autoimunes são mais prevalentes em portadoras da PM com FXTAS ou FXPOI, do que nas portadoras da PM que não têm FXTAS ou FXPOI (WINARNI et al., 2012).

No entanto, no trabalho de Hunter e colaboradores (2010), não foram observadas diferenças significativas em relação à grande maioria das doenças perguntadas, quando foram analisadas 334 portadoras da PM vs. 203 controles, demonstrando inconstância na observação destas doenças entre os diferentes estudos.

Cento e dez filhas de homens com FXTAS (carreadoras obrigatórias da PM) e 43 controles participaram do estudo de Chonchaiya e colaboradores (2010), no qual foi observado que as filhas de homens com FXTAS apresentam traços dos problemas que também aparecem na síndrome paterna, como tremores (13.6% filhas de FXTAS vs. 0% controle), dificuldades no equilíbrio (27.3% filhas de FXTAS vs. 0% controle) e na memória (38.9% filhas de FXTAS vs. 7% controle), com início dos sintomas na faixa dos 40 anos. Outras doenças significativas entre as filhas de homens com FXTAS vs. controle foram tonturas (28.4% filhas de FXTAS vs. 5.1% controle), disfunção ovariana/menstrual (74.1% filhas de FXTAS vs. 38.5% controle) e distúrbios do sono (65.1% filhas de FXTAS vs. 32.6% controle). Problemas não significativos levantados no estudo, porém mais frequentes nas filhas de homens com FXTAS, incluíam fraqueza nas pernas, problemas de tireoide, hipertensão e enxaquecas (CHONCHAIYA et al., 2010).

Seltzer e colaboradores (2012), ao compararem 30 portadores da PM (reunindo homens e mulheres) com dados de 2.800 controles na população, encontraram diferenças significativas com relação à presença de problemas nos pré-mutados, como dormência nos membros, tonturas e desmaios, embora a amostra de pré-mutados fosse pequena.

Hundscheid e colaboradores (2003) investigaram se 152 portadoras da PM apresentavam maior frequência de doenças associadas com a menopausa, como osteoporose e problemas cardiovasculares, comparando-as com 112 controles. Suas conclusões mostraram que a frequência de doenças entre as portadoras da PM não apresentavam diferenças significativas do controle, porém, o autor e seus colaboradores verificaram entre portadoras da PM e controle, diferenças com relação à densidade mineral óssea (5.3% portadoras da PM vs. 0% controle), que seria menor nas portadoras da PM, o que aumenta o risco para o desenvolvimento da osteoporose.

Quando são realizadas pesquisas com portadoras da PM com e sem FXTAS, é forte o indicativo de que problemas, como tremor, dormência nos membros e doenças autoimunes são mais frequentes em mulheres que já têm o diagnóstico da FXTAS do que entre aquelas que não o têm, indicando possíveis correlações entre a FXTAS e estas desordens (COFFEY et al., 2008; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009; WINARNI et al. 2012).

#### **1.4.4 Depressão, ansiedade e problemas emocionais**

Já foram observados em estudos que as portadoras da PM apresentam uma maior frequência de indicadores de ansiedade e depressão, quando comparadas com controles (ROBERTS et al., 2009; HUNTER et al., 2010; LACHIEWICZ et al., 2010).

Estudos têm feito correlações entre o número de repetições CGG presentes no gene *FMRI* e a frequência de problemas emocionais. Johnston e colaboradores (2001) correlacionaram o tamanho das repetições, constatando uma correlação positiva entre a PM e a depressão, especialmente naquelas com repetições acima de 100, nas 85 mulheres pré-mutadas que participaram do estudo, e, possivelmente, esta relação também ocorre entre os homens pré-mutados (HUNTER et al., 2008a). No entanto, recentemente se observou a relação de PM e depressão de modo inverso (repetições abaixo de 100=mais depressão), em um grupo de 82 mulheres pré-mutadas (ROBERTS et al., 2009). O autor e seus colaboradores sugerem de que fatores que tornariam a mulher mais vulnerável a apresentar a depressão,

além da presença da PM e do tamanho das repetições CGG, seria o fato de serem solteiras ou separadas, pois um parceiro proporcionaria mais suporte para a mulher, durante a criação de um filho com a SXF (ROBERTS et al., 2009).

Traços de TDAH ou TDAH, característica que aparece na SXF, seriam desordens presentes em algumas portadoras da PM, hipótese levantada nos estudos de Hunter e colaboradores (2008b) e Hunter e colaboradores (2010). Achados adicionais, como, problemas de atenção, de memória e dificuldades de aprendizagem nas portadoras da PM também foram observados por estes autores (HUNTER et al., 2008b; HUNTER et al., 2010).

Hessl e colaboradores (2005) verificaram associação significativa entre mulheres pré-mutadas e a presença de transtorno obsessivo compulsivo, ideação paranoide e ansiedade fóbica. Agorafobia, estresse pós-traumático e fobia social também já foram observados serem mais frequentes em portadoras da PM do que na população em geral (HUNTER et al., 2008a; ROBERTS et al., 2009).

Da mesma maneira que se observa ocorrer uma maior frequência de doenças autoimunes, tremores e dormência nas mulheres com PM e FXTAS, distúrbios psicológicos (como depressão e somatização) seriam também mais intensos nas mulheres que têm estas duas condições associadas (PM e FXTAS) (HESSL et al., 2005).

#### **1.4.5 Dificuldades na matemática**

A dificuldade em matemática em portadoras da PM foi observada no trabalho de Lachiewicz e colaboradores (2006). Neste trabalho foram analisadas 39 mulheres com PM, através de um teste que envolvia questões de matemática (aritmética). Verificou-se que 21% das mulheres apresentaram pontuação baixa, quando comparado com estudos semelhantes na população geral, que mostram que menos de 15% das pessoas apresentam dificuldades nesta área.

## 2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, têm ocorrido importantes progressos na identificação e na caracterização dos fenótipos associados à PM da SXF. Está bem estabelecido que, em média, 40% dos homens pré-mutados com 50 anos ou mais, podem desenvolver a FXTAS, assim como aproximadamente 20% das mulheres pré-mutadas, FXPOI. A partir de 2001, novos sintomas passaram a ser investigados, e verificou-se que portadoras da PM podem ser mais propensas a apresentar ansiedade, depressão, dormência e formigamento nos membros, distúrbios da tireoide, fibromialgia e tremor (JONHSTON et al., 2001; HESSL et al., 2005; COFFEY et al., 2008; ROBERTS et al., 2009; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009; CHONCHAIYA et al., 2010; LACHIEWICZ et al., 2010; WINARNI et al., 2012). Embora estas desordens ocorram devido a um mecanismo separado da SXF e afetem indivíduos pré-mutados, todas são causadas por alterações no mesmo gene. Por isto, a pesquisa com pré-mutados representa um caminho para uma melhor compreensão do funcionamento do gene *FMRI* (RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009).

O presente trabalho tem como propostas delinear novos fenótipos que auxiliem no entendimento dos sistemas afetados nas portadoras da PM da SXF, além de confirmar sintomas já existentes na literatura e que estas informações possam ser utilizadas em futuras pesquisas, como por exemplo, a criação de um instrumento de triagem que possa ser utilizado pelos médicos para facilitar a seleção de mulheres para as quais deve ser indicado o teste da PM. A triagem das portadoras da PM é fundamental, pois, a partir de um teste positivo de PM, se seguirá o aconselhamento genético, alertando a família dos riscos do aparecimento de SXF, da FXPOI e da FXTAS (CARO et al., 2008; ABRAMS et al., 2012).

Descobrir ser portadora da PM permitirá que a mulher faça uma escolha consciente quanto ao planejamento familiar, pois ela saberá dos riscos aos quais estará se submetendo, caso decida engravidar naturalmente, podendo desta forma, reduzir os riscos de aparecimento de novos casos de DI na família. Outra vantagem advinda do aconselhamento genético são as opções reprodutivas, por exemplo, a seleção de gametas sem a PM ou o congelamento de oócitos (MURRAY et al., 1997; ABRAMS et al., 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterização de um grupo de mulheres portadoras da PM brasileiras, com relação aos aspectos clínicos - presença de doenças/desordens/dificuldades/aptidões (fenótipos) que estas apresentam ou apresentaram ao longo de suas vidas, comparadas a um grupo de mulheres aleatórias na população (controle), a fim de verificar se existem diferenças significativas entre os grupos em relação à ocorrência dos problemas investigados.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Elaboração de um questionário inicial com base nos dados da literatura e em dados informais obtidos diretamente junto a membros da Associação Catarinense do X-Frágil e pesquisadores, para ser utilizado como instrumento investigativo no presente trabalho;
- 2.** Comparação dos dados obtidos com os encontrados na literatura;
- 3.** Elaboração de um instrumento de triagem (questionário final), a partir dos dados observados na pesquisa e na literatura, que possa ser utilizado por clínicos das áreas de endocrinologia, ginecologia e neurologia, para triar pacientes candidatas a realização do teste para a pré-mutação da SXF.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS GERAIS

Este trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) e obteve aprovação sob o registro 2273/11.

As mulheres do presente estudo foram reunidas através de colaboração com o Laboratório de Genética Neurogene, localizado em Florianópolis, Santa Catarina (SC).

### 4.2 GRUPO AMOSTRAL

O grupo amostral é composto por 166 mulheres, separadas em dois grandes grupos: portadoras da PM (n=77) e controle (n=89). As portadoras da PM e o controle são constituídos por dois grupos cada, descritos a seguir.

#### 4.2.1 Portadoras da PM identificadas pelo teste de PCR para FRAXA

Grupo composto por 49 mulheres, que realizaram o exame de PCR para FRAXA no Laboratório Neurogene, cujo resultado detectou a presença da PM no gene *FMRI* (entre 55 a 200 repetições). Estas mulheres foram identificadas por testes, devido ao fato de apresentarem casos na família de SXF (filhos e irmãos) ou menopausa precoce. Uma exceção neste grupo foi apenas uma portadora da PM que fez o exame de *Southern Blotting*, ao invés da PCR para FRAXA.

#### 4.2.2 Portadoras da PM que não fizeram o teste de PCR para FRAXA

Grupo composto por 28 portadoras da PM que não fizeram o exame genético de PCR para FRAXA, por opção, mas que tinham pelo menos um filho (homem ou mulher) com a SXF, detectada pelo exame de *Southern Blotting*, devido à expansão CGG superior a 200 repetições. Estas mulheres foram localizadas através das famílias das portadoras que fizeram

o teste de PCR para FRAXA, ou através de seus próprios filhos, que têm o diagnóstico da SXF.

#### **4.2.3 Controles identificados pelo teste de PCR para FRAXA**

O terceiro grupo é composto por 19 mulheres que receberam indicações clínicas para a realização do exame para a PM da SXF, como, filhos com dificuldades de aprendizagem e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Também foram incluídas neste grupo, mães de portadoras da PM e irmãs de afetados pela SXF que não apresentavam PM. Todas as mulheres neste grupo têm de 20 a 38 repetições CGG nos dois genes *FMRI*, classificadas com o genótipo normal.

#### **4.2.4 Controles que não fizeram o teste de PCR para FRAXA**

O quarto grupo é constituído 70 mulheres da população. O critério de inclusão no grupo de controle foi de que as mesmas não apresentassem casos de DI ou autismo na família. Assim, estas mulheres foram consideradas, teoricamente como não portadoras da PM. Neste grupo não foi realizado o teste de PCR para FRAXA e nem o *Southern Blotting*. Um critério levado em consideração no grupo controle da população sem exames foi a idade, de modo que as entrevistadas estivessem preferencialmente, na faixa dos 40-45 anos, pois esta faixa de idade se encontrava de modo mais frequente entre as mulheres portadoras da PM que fizeram o teste de PCR para FRAXA, dado que teve levantamento prévio. Estas mulheres do grupo controle entrevistadas para a pesquisa foram abordadas em postos de saúde da Grande Florianópolis, no Hospital Universitário (HU-UFSC), no campus da UFSC, lojas, supermercados e regiões próximas da cidade de Florianópolis.

### **4.3 AUTORIZAÇÃO PARA A PESQUISA**

Todas as mulheres foram convidadas a participar da pesquisa e foram esclarecidas por escrito, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**). No referido documento, há informações sobre os benefícios e riscos da participação na pesquisa. Elas também receberam a declaração de consentimento e ao assinarem esta declaração, permitiram que suas informações fossem utilizadas no presente trabalho. Para todas as

mulheres houve, além do esclarecimento por escrito, esclarecimento verbal sobre a pesquisa. A grande maioria das mulheres portadoras da PM foi esclarecida sobre a pesquisa via telefone ou e-mail e as mulheres do grupo controle foram esclarecidas presencialmente. Para aquelas esclarecidas por e-mail ou telefone, o TCLE e a declaração de consentimento foram mandados também por carta ou e-mail, e a declaração de consentimento foi assinada e devolvida, por carta ou e-mail. Para as mulheres esclarecidas presencialmente, o TCLE foi entregue no mesmo dia e a declaração de consentimento foi assinada e devolvida, no momento em que a entrevista for realizada. O mesmo procedimento foi seguido para a aplicação dos questionários: e-mail, telefone ou presencialmente.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS REPETIÇÕES CGG NO GENE *FMRI*

O protocolo de identificação das repetições CGG presentes no gene *FMRI* (PCR para FRAXA e eletroforese) foram adotados segundo a técnica de Saluto e colaboradores (2005).

#### 4.5 QUESTIONÁRIO

O questionário, aplicado ao grupo de mulheres portadoras da PM e grupo de mulheres controle, é um questionário semiaberto, conforme delineado no **Apêndice B**. Ele contém questões sobre a presença ou ausência (valendo como respostas sim ou não) de sintomas encontrados na literatura para portadoras da PM. Ele foi elaborado após pesquisa bibliográfica baseadas nos trabalhos de Coffey e colaboradores (2008) e Hunter e colaboradores (2010), principalmente e sugestões fornecidas por membros representantes da Associação Catarinense do X-Frágil e pesquisadores que acompanham os trabalhos nesta área. Também foi disponibilizado um espaço aberto para incluir outras possíveis condições clínicas. Todo o questionário foi completado por autorrelato das mulheres, que incluíam problemas com diagnóstico médico e problemas que elas relatavam sentir (autopercepções).

#### 4.6 LOCAL DA PESQUISA

Pelo fato de muitas mulheres portadoras da PM residirem em várias localidades do estado e inclusive em outros estados (aproximadamente 73% delas), optou-se pela realização das entrevistas por telefone. Quando não foi possível a entrevista por telefone, o questionário foi enviado e respondido por e-mail. Apenas para as mulheres do grupo controle que não fizeram os exames de PCR para FRAXA, as entrevistas foram realizadas de modo presencial.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas adotadas foram: o teste  $t$  de *Student*, para a comparação das médias de idade entre as mulheres portadoras da PM e controle. Nesta análise é testada a hipótese nula - hipótese segundo a qual as duas amostras de mulheres tenham sido extraídas de populações equivalentes e qualquer diferença entre elas seja devida apenas ao erro amostral (LEVIN & FOX, 2004). Para verificar se as diferenças amostrais são estatisticamente significativas, costuma-se estabelecer um nível de significância, que representa o nível de probabilidade em que a hipótese nula possa ser rejeitada com confiança (LEVIN & FOX, 2004). Neste trabalho será adotado um nível de significância de 0.05 (ou 95% de confiança), o que significa dizer que a hipótese nula será rejeitada se houver a probabilidade inferior a 5% de que a diferença seja devida apenas ao erro amostral.

Na comparação dos grupos de mulheres em relação à presença ou ausência dos fenótipos, optou-se por selecionar os seguintes testes estatísticos: Teste Exato de *Fisher* e o  $X^2$  (Qui-quadrado). Estes testes avaliam as diferenças entre os grupos (portadoras da PM vs. controle) em relação a cada um dos fenótipos. Cada desordem perguntada aos dois grupos de mulheres apenas admite um de dois tipos de resposta: presença (sim) ou ausência (não) e não admite para uma mesma entrevistada as duas respostas. Isto leva a construção de uma tabela de contingência 2x2 (quatro células). Para as doenças que apresentarem em pelo menos uma das células o valor esperado menor que 5, a probabilidade ( $p$ ) será dada através do Teste Exato de *Fisher*, para as outras, será pelo  $X^2$ .

Em estudos epidemiológicos de caso-controle, quando se suspeita que um fator de risco (no caso deste estudo, a PM) possa estar associado a um desfecho (uma doença, por exemplo), utilizam-se medidas de associação, como o *Odds Ratio* (OR) (SCHMIDT &

KOHLMANN, 2008). O OR nos mostra quantas vezes o desfecho é mais frequente entre aqueles com o fator de risco do que entre aqueles que não têm o fator, em outras palavras, o quanto de chance há de que uma pessoa desenvolva o desfecho (doença) estando exposta ao fator de risco (PM) (**Tabela 3**). De maneira simplificada, obtemos o valor de OR através da construção de uma tabela de contingência 2x2, semelhante ao  $X^2$ , como a mostrada a seguir:

**Tabela 3:** Como é estruturada a tabela de contingência 2x2 para o cálculo do OR.

Fator de risco	Desfecho presente	Desfecho ausente	<b>Total</b>
Presente	A	B	A+B
Ausente	C	D	C+D
<b>Total</b>	A+C	B+D	A+B+C+D

Fonte: Adaptado de Schmidt & Kohlmann (2008).

A fórmula do OR é expressa por:  $AD/BC$ , ou seja, a razão entre o número de pessoas positivas para o fator de risco e positivas para o desfecho, multiplicado pelo número de pessoas negativas para o fator de risco e negativas para o desfecho, dividido pelo número de pessoas com o fator de risco positivo, mas com o desfecho negativo multiplicado pelo número de pessoas com o fator de risco negativo, mas que são positivas para o desfecho.

Valores de OR com valor 1 ou muito próximos de 1 indicam que não há associação entre o fator de risco e o desfecho, enquanto que valores maiores que 1, indicam maiores chances de desenvolver a doença. Valores inferiores a 1 indicam efeito protetor em relação ao desenvolvimento da doença. Se o intervalo de confiança presente na amostra incluir valores que passam pelo número 1, ele não é considerado estatisticamente significativo, visto que existe a probabilidade de que não haja diferenças entre os dois grupos.

Para as portadoras da PM que fizeram os testes de PCR para FRAXA, foi realizada uma análise adicional: a correlação de Pearson ( $r$ ) entre as idades em que entraram em menopausa e o número de repetições CGG e a correlação entre as idades em que começaram a apresentar problemas de tireoide e o número de repetições CGG, a fim de verificar se o desenvolvimento precoce ou tardio destes problemas tem relação linear com o número de repetições CGG.

Para todas as análises foram utilizadas as ferramenta do site *VassarStats*, considerando 95% de confiança.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ELABORAÇÃO DO QUESTIONÁRIO E ENTREVISTAS

O questionário utilizado para as entrevistas (**Apêndice B**) foi elaborado com base na revisão bibliográfica e com o acréscimo das questões, para complementá-lo: facilidade/dificuldade em redação, crise de ausência, psicose, fraqueza muscular, AVC, problemas renais, alterações no sangue, problemas dentários e infarto, que foram sugeridas por membros da Associação Catarinense do X-Frágil.

As entrevistas foram realizadas entre os períodos de dezembro de 2011 a novembro de 2012. Foram entrevistadas no total, 166 mulheres, sendo 77 mulheres portadoras da PM, que incluíam 49 que fizeram o teste para FRAXA e 28 não fizeram o teste. No grupo controle, foram entrevistadas 89 mulheres, sendo que destas, 70 não fizeram o teste para FRAXA e 19 fizeram, devido a indicações clínicas, cujo resultado se encontrava na normalidade para as repetições CGG (20-38 CGG). Em relação às mulheres portadoras da PM entrevistadas para este estudo, estas não residem apenas no estado de Santa Catarina, mas também nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso, São Paulo e Rio de Janeiro. Uma delas reside fora do país.

Entre as mulheres portadoras da PM convocadas para participar da pesquisa, uma se recusou, alegando que não gostaria de divulgar suas informações.

Cinco mulheres que fizeram o exame genético foram incluídas no estudo, mas não haviam feito os exames no laboratório Neurogene. Quatro delas fizeram o exame de PCR para FRAXA que comprovaram a PM e a quinta fez o exame de *Southern Blotting* e não foi possível obter da entrevistada o número de repetições CGG.

Ao longo da coleta de dados na população de controles, apenas uma mulher foi excluída do estudo, pois alegou ter dois casos na família de pessoas na família com DI, de causa desconhecida.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE MULHERES

As idades das mulheres entrevistadas variaram de 18 a 82 anos, sendo que a média de idade do grupo total foi de 44.3 anos. Nesta análise, os grupos de mulheres foram separados

em portadoras da PM vs. controle (**Tabela 4**). Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação às médias de idade, assim como a ascendência e a cor da pele. Foi preponderante a porcentagem de mulheres que se declararam de pele cor branca e origem europeia em ambos os grupos. Na categoria de outras ascendências, 20.8 % das pré-mutadas e 31.5% do controle se declararam descendentes de brasileiros, não sabendo responder a origem exata das suas respectivas famílias.

**Tabela 4:** Caracterização demográfica do grupo de mulheres do estudo.

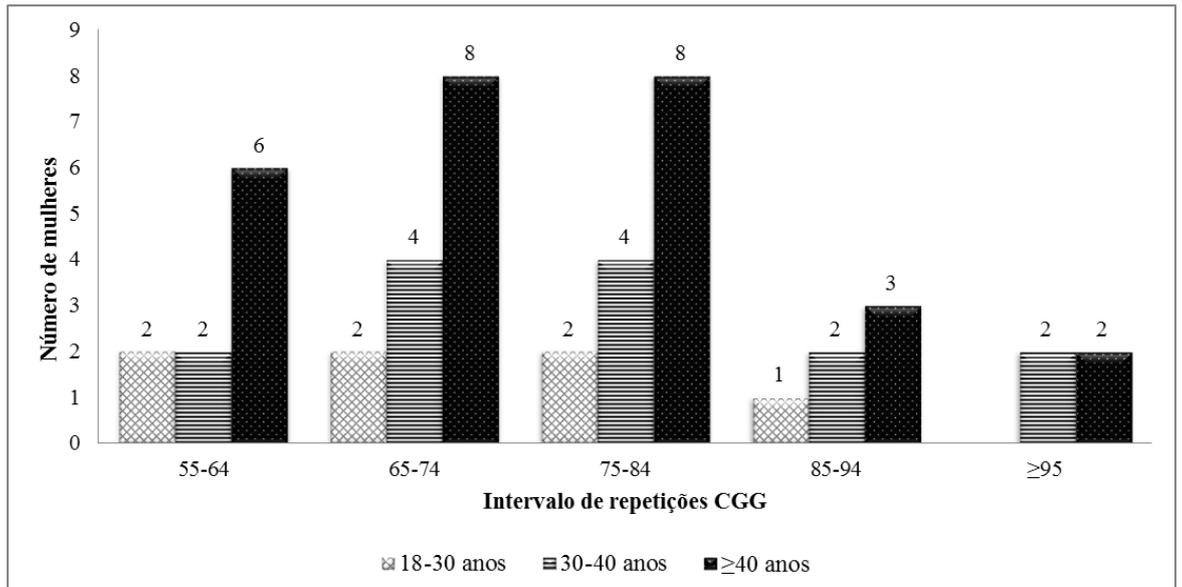
Parâmetros	Portadoras da PM (n=77)	Controle (n=89)	Valor de <i>p</i>
<b>Idade</b>			
Média ± desvio padrão	44.7 ± 14.1	43.9 ± 12.3	0.62
<b>Ascendência % (n)</b>			
Europeia	63.6 (49)	55.0 (49)	0.44
Indígena	3.9 (3)	2.3 (2)	
Outras	20.8 (16)	31.5 (28)	
Mais de uma categoria	11.7 (9)	11.2 (10)	
<b>Cor da pele % (n)</b>			
Branca	93.5 (72)	91.0 (81)	0.41
Negra	0.0	2.3 (2)	
Parda	6.5 (5)	6.7 (6)	
<b>Educação % (n)</b>			
Até o 1º grau completo	19.5 (15)	36.0 (32)	<b>0.02*</b>
2º grau completo ou mais	80.5 (62)	64.0 (57)	

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

\*Valor de *p* considerado significativo ( $p < 0.05$ ).

Em relação à escolaridade, os dois grupos de mulheres são diferentes. Percebe-se que 80.5% das portadoras da PM têm o 2º grau completo ou mais, contrastando com apenas 64% do controle ( $p = 0.02$ ).

Selecionando apenas as portadoras que fizeram o teste de PCR para FRAXA, a **Figura 5** mostra a caracterização das mesmas, conforme a idade e o número de repetições CGG. Uma das portadoras da PM não foi incluída na figura, pois fez exame de *Southern Blotting* e não forneceu o número de repetições CGG.



**Figura 5:** Caracterização do grupo de portadoras da PM que fizeram o teste de PCR para FRAXA, separadas por idade e número de repetições CGG.

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

É possível observar que grande parte das mulheres têm, entre 65 e 84 repetições CGG e 40 anos ou mais. Não havia portadoras da PM com mais de 100 repetições CGG no grupo estudado.

### 5.3 DOENÇAS/DESORDENS NAS MULHERES ENTREVISTADAS

As doenças/desordens/aptidões foram separadas em dois grupos: aquelas que tiveram um diagnóstico médico e aquelas sem o diagnóstico preciso, mas que a mulher relatava sentir ou já ter sentido (autopercebidos) (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Descrição das doenças/desordens/aptidões nos grupos de mulheres, separadas por autopercepção e diagnóstico.

<b>Autopercebidos</b>	<b>Diagnosticados</b>
Ansiedade	Problemas ósseos
Depressão	Problemas renais
Dores de cabeça intensas/enxaquecas	Problemas articulares
Dores musculares	Alterações no sangue
Tremor	Câncer
Fraqueza muscular	Menopausa Precoce
Dormência e/ou formigamento	Problemas na tireoide
Tonturas	Hipertensão
Desmaios	Convulsões
Desatenção	Infarto
Isola-se das pessoas	AVC
Crise de ausência	Fibromialgia
Psicose	
Alteração dentária	
Facilidade de aprendizagem	
Dificuldade de aprendizagem	
Facilidade em matemática	
Dificuldade em matemática	
Facilidade em redação	
Dificuldade em redação	

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

A seguir, na **Tabela 6** estão descritas as frequências dos fenótipos obtidos para os dois grupos de mulheres, com seus respectivos valores de  $p$  e OR.

**Tabela 6:** Comparação entre portadoras da PM (n=77) e controle (n=89), com relação à presença dos fenótipos.

Fenótipos Autopercebidos	Portadoras da PM		Controle		Estatística		
	n=77	%	n=89	%	Valor de <i>p</i>	OR	IC (95%)
Ansiedade	53	68,83%	61	68,54%	1.000	1.014	0.525; 1.957
Depressão	30	38,96%	33	37,08%	0.806	1.083	0.578; 2.030
Enxaquecas	40	51,95%	33	37,08%	<b>0.054*</b>	1.835	0.986; 3.412
Dores musculares	30	38,96%	18	20,22%	<b>0.008**</b>	2.518	1.262; 5.024
Tremor	13	16,88%	19	21,35%	0.467	0.748	0.342; 1.637
Fraqueza muscular	13	16,88%	9	10,11%	0.199	1.806	0.726; 4.491
Dormência e/ou formigamento	28	36,36%	26	29,21%	0.356	1.357	0.708; 2.600
Tonturas	26	33,77%	32	35,96%	0.7642	0.908	0.478; 1.723
Desmaios	8	10,39%	5	5,62%	0.393	1.948	0.609; 6.225
Desatenção	19	24,68%	18	20,22%	0.493	1.292	0.621; 2.687
Isola-se das pessoas	17	22,08%	14	15,73%	0.294	1.518	0.693; 3.326
Crise de ausência	12	15,58%	9	10,11%	0.409	1.641	0.651; 4.135
Psicose	12	15,58%	17	19,10%	0.554	0.782	0.347; 1.760
Alteração dentária	15	19,48%	18	20,22%	0.920	0.954	0.444; 2.051
Facilidade de aprendizagem	31	40,26%	46	51,69%	0.141	0.63	0.340; 1.167
Dificuldade de aprendizagem	23	29,87%	21	23,60%	0.362	1.379	0.691; 2.753
Facilidade em matemática	23	29,87%	37	41,57%	0.117	0.599	0.314; 1.141
Dificuldade em matemática	34	44,16%	26	29,21%	<b>0.046**</b>	1.916	1.009; 3.638
Facilidade em redação	31	40,26%	28	31,46%	0.237	1.468	0.775; 2.780
Dificuldade em redação	19	24,68%	26	29,21%	0.512	0.794	0.398; 1.583
Diagnosticados	n=77	%	n=89	%	Valor de <i>p</i>	OR	IC (95%)
Problemas ósseos	13	16,88%	9	10,11%	0.199	1.805	0.725; 4.491
Problemas renais	12	15,58%	9	10,11%	0.409	1.641	0.651; 4.135
Problemas articulares	8	10,39%	13	14,61%	0.6	0.678	0.265; 1.734
Alterações no sangue	13	16,88%	14	15,73%	0.841	1.088	0.476; 2.484
Câncer	6	7,79%	5	5,62%	0.806	1.419	0.416; 4.848
Menopausa precoce	11	14,86%	0	0,00%	<b>&lt;0.001**</b>	32.42	1.876; 560.1
Problemas na tireoide	13	16,88%	10	11,24%	0.294	1.605	0.660; 3.899
Hipertensão	12	15,58%	22	24,72%	0.145	0.562	0.257; 1.229
Convulsões	2	2,60%	3	3,37%	1.000	0.764	0.124; 4.698
AVC	2	2,60%	1	1,12%	0.597	2.347	0.209; 26.39
Infarto	0	0,00%	2	2,25%	1.000	0.3806	0.015, 9.478
Fibromialgia	2	2,60%	2	2,25%	1.000	1.16	0.159; 8.437

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

\*Valor de *p* próximo ao nível de significância.

\*\* Valor de *p* considerado significativo ( $p < 0.05$ ).

Como sumarizado na **Tabela 6**, os problemas que diferiram entre portadoras da PM e controles, estatisticamente significativos, foram: dores musculares (38.96% portadoras da PM vs. 20.22% controle;  $p=0.008$ ), dificuldade em matemática (44.16% portadoras da PM vs.

29.21% controle,  $p=0.046$ ) e menopausa precoce (14.86% portadoras da PM vs. 0% controle;  $p<0.001$ ). Dores de cabeça intensas/enxaquecas ficaram próximas do nível de significância (51.95% portadoras da PM vs. 37.08% controle;  $p=0.054$ ).

Os outros problemas, tais como: depressão, ansiedade, tonturas, alteração dentária (ex. queda de dentes), alterações no sangue (ex. anemia, leucopenia), convulsões, câncer, AVC, infarto, fibromialgia, dormência/formigamento nos membros, fraqueza muscular, desmaios, desatenção, isolamento, crise de ausência, problemas renais (ex. infecção renal, cálculo renal), articulares (ex. artrite, artrose), ósseos (ex. osteopenia, osteoporose), tireoide (ex. hipertireoidismo, hipotireoidismo), hipertensão, tremor, psicose, facilidade/dificuldade de aprendizagem, facilidade/dificuldade em redação e facilidade em matemática não diferiram de modo significativo entre os dois grupos de mulheres.

Em relação à alteração dentária, em portadoras da PM, 11 tiveram queda de dentes, 3 relataram que os dentes “esfarelaram” e 1 relatou que um dos dentes tinha a raiz encurtada. Entre o grupo controle, 18 mulheres relataram que tiveram queda de dentes. Para as alterações sanguíneas, 11 portadoras da PM relataram ter ou já ter tido anemia, 1 anemia falciforme e 1 leucopenia. Para o controle, 12 mulheres relataram ter ou já ter tido anemia e 2 leucopenia. Em relação aos problemas de tireoide, em portadoras da PM, foram 9 casos de hipotireoidismo, sendo que uma delas desenvolveu hipertireoidismo após o hipotireoidismo, 3 casos de hipertireoidismo, sendo um deles hipotireoidismo com nódulo e 1 caso de apenas nódulo; para controle, foram 7 casos de hipotireoidismo, 1 caso de hipertireoidismo com nódulo e 2 com apenas nódulo. Em relação ao câncer, para as portadoras da PM, foram 3 casos de câncer de mama, sendo um deles também de fígado, 1 de útero e 2 de pele, enquanto que, para o controle, foram 2 casos de câncer de mama, 2 de útero e 1 de fígado. Para os problemas ósseos, em portadoras da PM, foram 7 casos de osteopenia, 4 de osteoporose, 1 de descalcificação e 1 de baixa densidade óssea. No controle, foram 7 casos de osteoporose e 2 osteopenia. Para os problemas renais, em portadoras da PM, foram com 9 casos de cálculo renal, 1 de nefrite, 1 de infecção renal e 1 de insuficiência renal. Para o controle, foram 5 casos de cálculo renal, 2 casos de cisto renal, 1 de nefrite e 1 caso de infecção renal crônica. Para os problemas de articulação, em portadoras da PM, foram 6 casos artrose e 2 artrite. Para o controle, foram 7 casos de artrose, 5 artrite e 1 de febre reumática.

Em relação à menopausa precoce, em duas mulheres portadoras da PM, não foi possível determinar a idade de menopausa, pois haviam realizado cirurgia de histerectomia

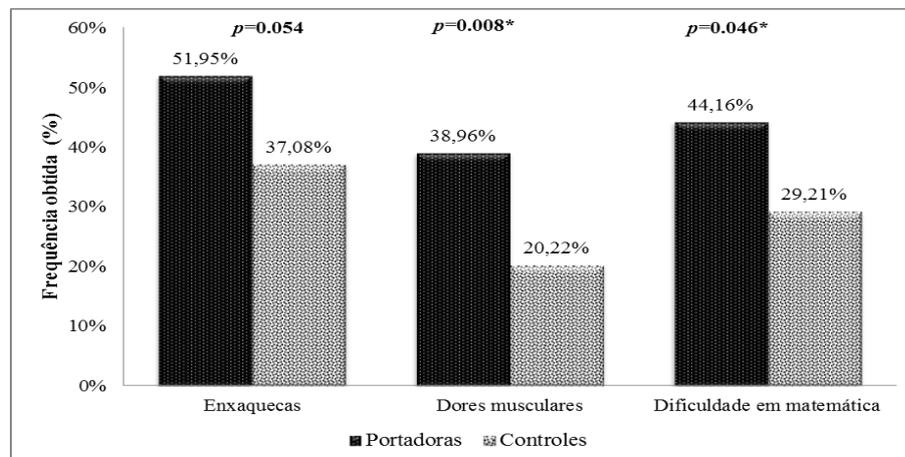
(idades de 32 e 36 anos) e uma das portadoras (36 anos) toma anticoncepcional de uso contínuo. Portanto, estas três foram excluídas desta análise. A média de idade de menopausa precoce no grupo das portadoras da PM foi de 32.8 anos. Selecionando apenas portadoras da PM que já passaram dos 40 anos no momento em que foi realizada a pesquisa, 21.95% (9/41) delas apresentou menopausa precoce.

Uma das portadoras da PM, cujo exame genético foi realizado no Laboratório Neurogene, faleceu devido um AVC (Acidente Vascular Cerebral) hemorrágico aos 66 anos e seus dados clínicos foram fornecidos por sua filha, que também autorizou a sua divulgação na pesquisa. Além disso, foram utilizadas neste estudo as informações de mais três portadoras da PM falecidas. Duas faleceram de câncer de mama e a terceira, em acidente. Os consentimentos para a utilização dos dados das mesmas foram fornecidos pelos parentes próximos (mãe, filha, marido).

São demonstradas nas figuras a seguir as doenças que apresentaram diferenças entre as portadoras da PM e o controle, baseados nos dados da tabela anterior.

### 5.3.1 Autopercebidos

A distribuição percentual das desordens verificadas entre as mulheres portadoras da PM e controles que se mais diferenciaram em relação às frequências autopercebidas estão apresentadas na **Figura 6**.



**Figura 6:** Comparação entre o grupo de portadoras da PM e controles, com relação às enxaquecas/dores de cabeça intensas, dores musculares e dificuldades em matemática.

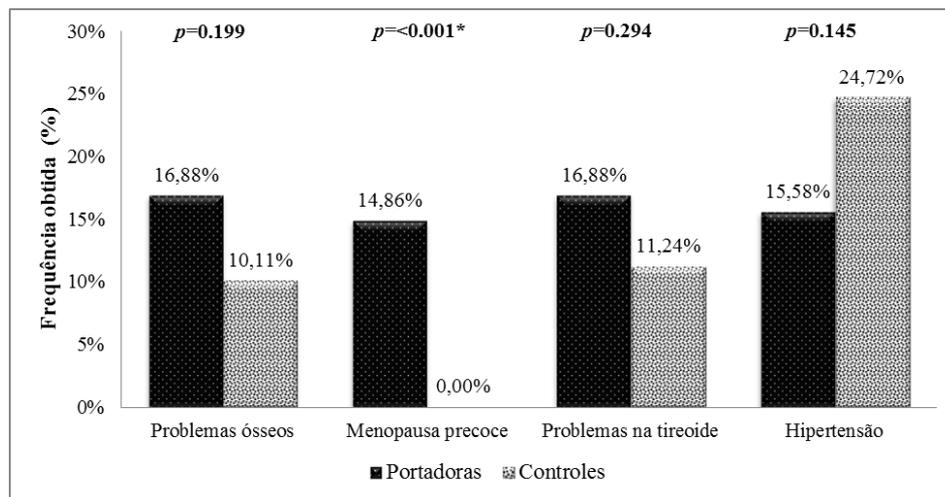
\*Valor de  $p$  considerado significativo ( $p<0.05$ ).

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

Em relação às enxaquecas/dores de cabeça intensas, o relato de presença foi mais frequente nas portadoras da PM do que nos controles, sem diferença estatisticamente significativa, porém se aproximou do limiar considerado significativo (OR [IC 95%] = 1.835 [0.986, 3.412],  $p = 0.054$ ). Quanto à presença de dores musculares e a dificuldade em matemática, houve significância estatística, sendo mais frequentes entre as portadoras da PM do que entre os controles em ambos os casos. Dores musculares (OR [IC 95%] = 2.518 [1.262, 5.024],  $p = 0.008$ ); Dificuldades em matemática (OR [IC 95%] = 1.916 [1.009, 3.638],  $p = 0.046$ ).

### 5.3.2 Diagnosticados

As principais diferenças entre as portadoras da PM e controles que tiveram diagnóstico são mostradas na **Figura 7**.



**Figura 7:** Comparação entre o grupo de portadoras da PM e controles, com relação à problemas ósseos, menopausa precoce, problemas de tireoide e hipertensão.

\*Valor de  $p$  considerado significativo ( $p < 0.05$ ).

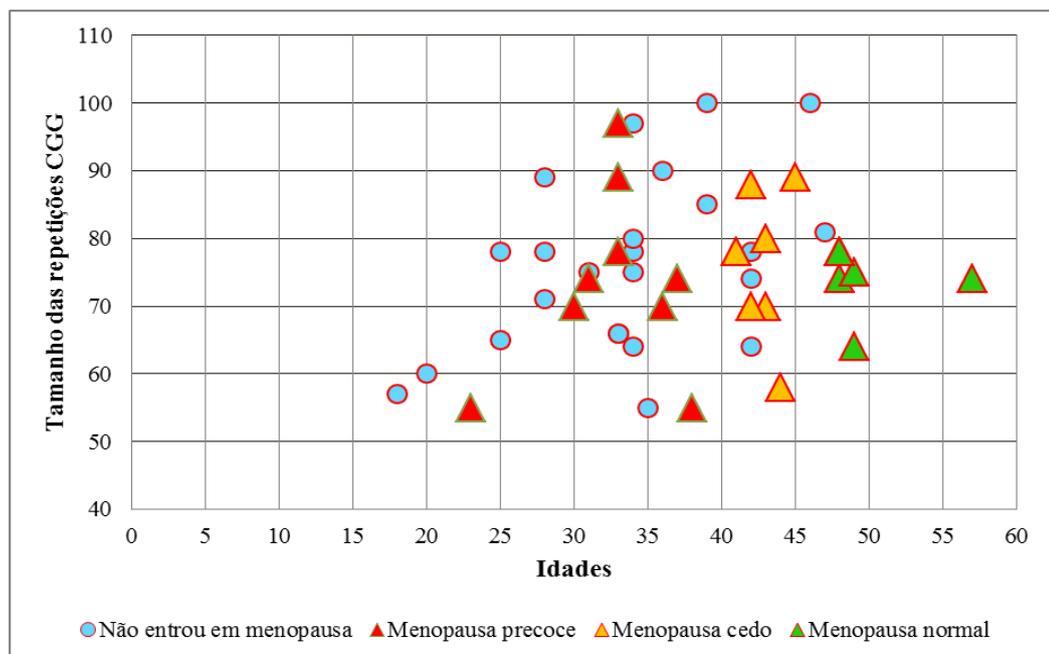
Fonte: Dados da pesquisa (2012).

A menopausa precoce foi o único problema com diagnóstico médico que apresentou diferença estatística significativa entre as portadoras da PM e controles, sendo que esta não ocorreu em nenhum indivíduo controle (OR [IC 95%] = 32.42 [1.876 – 560.1],  $p = < 0.001$ ). Problemas de tireoide (ex. hipotireoidismo, hipertireoidismo, nódulos) e problemas ósseos (ex. osteopenia, osteoporose, densidade mineral óssea baixa) foram mais frequentes em

portadoras da PM do que em controles, porém não diferiram de modo significativo. Problemas de tireoide (OR [IC 95%] = 1.605 [0.66 – 3.899],  $p= 0.294$ ); Problemas ósseos (OR [IC 95%] = 1.805 [0.725 – 4.491],  $p= 0.199$ ). A hipertensão foi mais frequente em controles do que em portadoras da PM, porém também sem significância estatística (OR [IC 95%] = 0.562 [0.257 – 1.229],  $p= 0.145$ ).

### 5.3.3 Menopausa em portadoras da PM

Abaixo, a **Figura 8** correlaciona o número de repetições CGG com as idades em que as portadoras da PM entraram em menopausa. Nesta figura também estão distribuídas as idades atuais das portadoras da PM que ainda não entraram em menopausa.



**Figura 8:** Relação entre o número de repetições CGG e a idade de menopausa entre as portadoras da PM, em contraste com a distribuição de idades das portadoras da PM que ainda não entraram em menopausa (n=46). Nesta análise foram excluídas três portadoras: uma que fez cirurgia de histerectomia antes de 40 anos; uma que fez tratamento de quimioterapia e teve o ciclo menstrual interrompido e uma que fez o exame de *Southern Blotting*. A definição de menopausa cedo foi estabelecida na faixa de 40-45 anos.

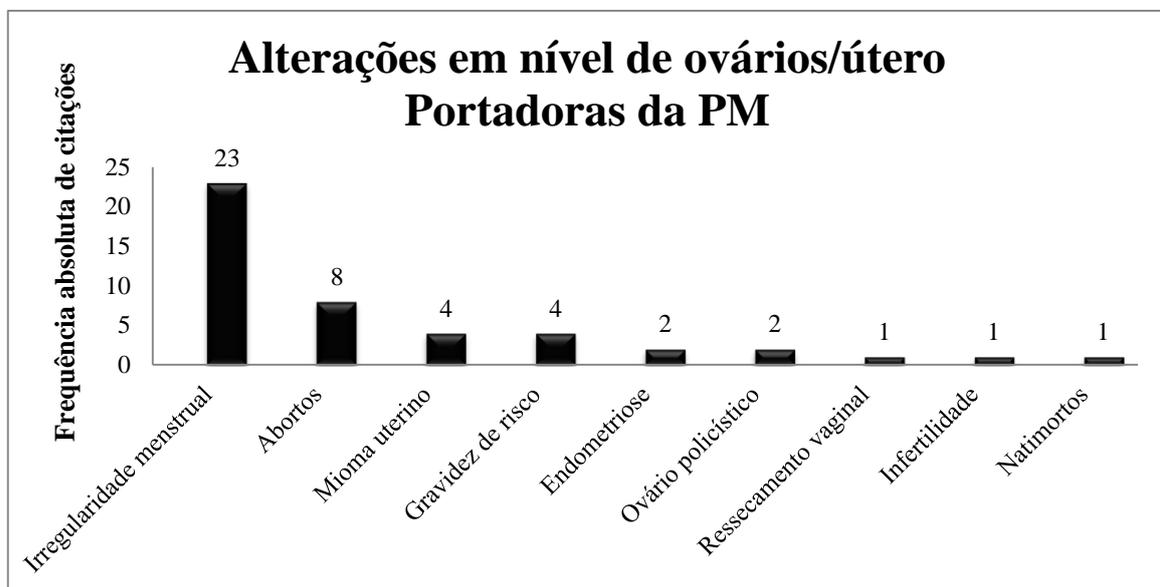
Fonte: Dados da pesquisa (2012).

A idade mais baixa de menopausa foi de 23 anos e a mais alta foi de 57 anos no grupo de portadoras da PM que fizeram o exame de PCR para FRAXA. Foi observada uma



### 5.3.5 Outros problemas citados pelas portadoras da PM espontaneamente

O questionário dispunha de um espaço para que as portadoras da PM acrescentassem suas informações, se assim o desejassem. O problema que obteve maior frequência de citações foram as alterações hormonais em nível de ovário/útero (**Figura 10**), relatados por 34 mulheres (44.16%), que incluíam pelo menos um destes itens: menstruação irregular (ciclos curtos, longos ou interrupção da menstruação por um mês ou mais), abortos espontâneos, mioma uterino, gravidez de risco, endometriose, ovário policístico, ressecamento vaginal, infertilidade e natimortos. Algumas portadoras da PM, contaram inclusive, que têm/tiveram dois ou mais destes problemas.

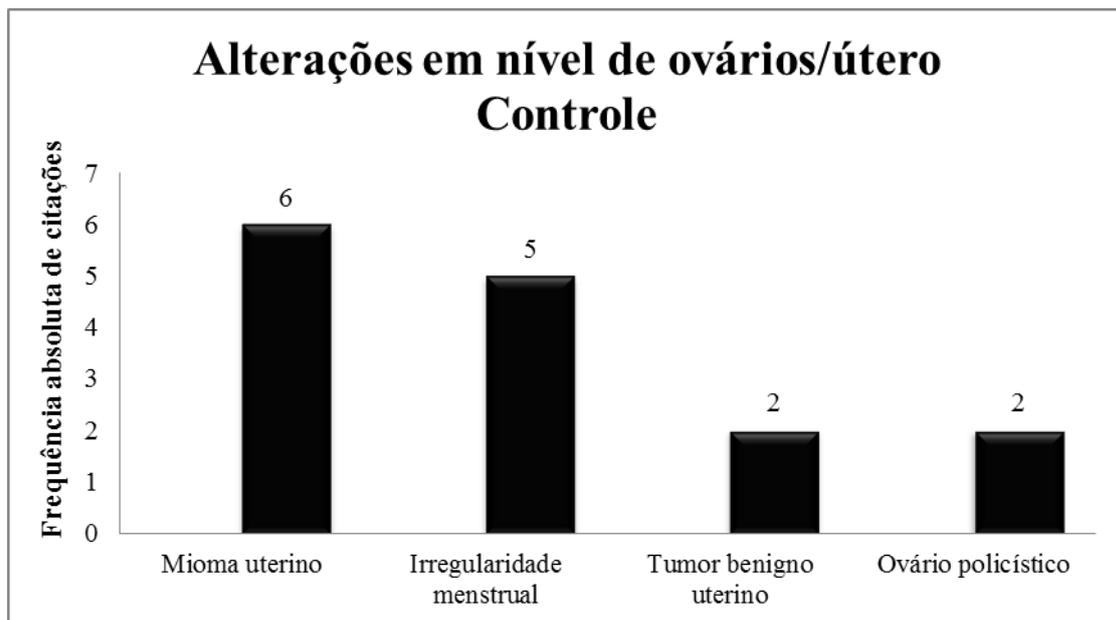


**Figura 10:** Frequência absoluta de citações espontâneas pelas portadoras da PM com relação às alterações hormonais em nível de ovário/útero.  
Fonte: Dados da pesquisa (2012).

Outros problemas reportados foram: orelhas em abano (6), timidez (4), instabilidade emocional (3), artrite reumatoide (3), cabelos ralos (3), síndrome do pânico (2), intestino irritável (2), esquecimentos ou “brancos” (2), obesidade (2), diabetes (1), alergias (1), problemas de insônia (1), perda da noção de espaço (1), febres frequentes (1), calcificação na mama (1), sinusite crônica (1) e prolapso na válvula mitral (1).

### 5.3.6 Outros problemas citados pelos controles espontaneamente

Em relação ao grupo de controles, os relatos espontâneos também se relacionavam com alterações hormonais em nível de ovário/útero (**Figura 11**), que foram citados por 14 mulheres (15.73%), incluindo mioma uterino (6), irregularidade menstrual (5), tumor benigno no útero (2) e ovário policístico (2).



**Figura 11:** Frequência absoluta de citações espontâneas pelos controles com relação às alterações hormonais em nível de ovário/útero.

Fonte: Dados da pesquisa (2012).

Outros problemas citados foram: diabetes (5), orelhas grandes (1), hérnia de disco (2), cabelos ralos (1), gastrite (1), colesterol alto (1) e esclerose múltipla (1).

## 6. DISCUSSÃO

Embora originalmente não se considerasse a PM como fator influenciável no desenvolvimento de doenças, nos últimos anos tem aumentado o número de relatos de problemas nos seus portadores, cuja origem estaria relacionada ao ganho tóxico provocado pelo excesso de mRNA *FMRI* (WILLEMSSEN et al., 2011).

O presente estudo foi o primeiro realizado no Estado de Santa Catarina que se propôs a investigar que tipos de problemas mulheres com PM de uma amostra selecionada (Laboratório Neurogene) apresentam ou apresentaram durante as suas vidas, em comparação com um grupo controle, a fim de verificar se os dados levantados corroboram com os relatados na literatura e identificar algum novo fenótipo, caso viesse a aparecer. A partir disto, foram entrevistadas, no total, 166 mulheres, sendo que 77 eram portadoras da PM (48 que fizeram o exame de PCR para FRAXA e uma que fez o *Southern Blotting*, além de 28 mulheres que não fizeram estes exames, mas que têm pelo menos um filho diagnosticado com SXF, devido à expansão CGG >200), 19 mulheres que fizeram o exame de PCR para FRAXA e que estavam na faixa considerada normal (20-38 repetições CGG) e que receberam a indicação para o exame por terem filhos com dificuldades de aprendizagem, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor ou que eram mães de portadoras da PM ou irmãs de afetados pela SXF e 70 mulheres controles, que não fizeram o exame de PCR para FRAXA, mas que foram tratadas como não portadoras pelo fato de não apresentarem casos de DI ou autismo na família. Optou-se por acrescentar as mulheres em que o exame genético resultou na faixa normal para *FMRI* ao grupo de controles da população para reduzir a margem de erro na amostra, caso tenha sido entrevistada alguma mulher da população na faixa zona *gray* ou pré-mutada. Lachiewicz e colaboradores (2010) e Smith e colaboradores (2010) conduziram estudos de caso e controle com mulheres pré-mutadas e não realizaram exames genéticos no grupo controle, alegando que a incidência da SXF é baixa na população. A probabilidade de se ter coletado entre os controles uma portadora da PM seria baixa, uma vez que se estima encontrar uma pré-mutada para cada 259 mulheres, aproximadamente (ROSSEAU et al., 1995). Para uma mulher com o alelo em zona *gray*, o risco seria um pouco mais elevado: 1 alelo zona *gray* em cada 35 mulheres (SELTZER et al., 2012), no entanto, mesmo que tal viés tenha ocorrido, isto causaria pouco impacto nos resultados finais.

As análises inicialmente se centraram em mostrar que tipos de doenças ou problemas as portadoras da PM com exame de PCR para FRAXA tiveram ao longo de suas vidas e, em seguida, comparar a frequência destes problemas com as de um grupo de controle, porém, ao longo da coleta de dados, foram acrescentadas mulheres que eram mães de crianças com SXF, mas que não fizeram o exame genético (n=28). Então, optou-se por acrescentá-las ao grupo de portadoras da PM, a fim de tornar a amostra robusta. Não era possível afirmar com absoluta certeza se estas 28 mulheres eram portadoras da PM, da mutação completa ou mesmo mosaicas, embora não aparentassem problemas de DI, característica presente em pelo menos 30% das mulheres que têm mutação completa (SHERMAN et al., 1985). Portanto, a probabilidade de que estas mulheres tenham a mutação completa não é descartada, porém é mais baixa do que a probabilidade de ser portadora da PM, fato embasado principalmente pela frequência de mutação completa e de PM encontradas na população.

É importante ressaltar que nenhuma mulher portadora da PM relatou na entrevista ter o diagnóstico da FXTAS, embora o problema não tenha sido perguntado de modo específico, dentro do questionário inicial.

Como esperado, a menopausa precoce diferiu estatisticamente entre os dois grupos de mulheres, sendo que não ocorreu em nenhuma mulher do grupo controle (14.86% portadoras da PM vs. 0% controle,  $p = <0.001$ ). O resultado obtido neste estudo, de 14.86% de frequência de menopausa precoce foi semelhante ao encontrado em um grupo de portadoras brasileiras da PM, estimado por Vianna-Morgante e colaboradores (1999), com 13.9% e ficou próxima da estimativa do estudo de Allingham-Hawkins e colaboradores (1999), com 16% de frequência. Ainda, segundo o cálculo do OR neste trabalho, em média, as portadoras da PM apresentariam uma chance de ~32.4 vezes maior de apresentar a menopausa precoce do que as mulheres que não têm a PM. Este último resultado, no entanto, é uma estimativa e não deve ser tomado como uma chance absoluta, pois varia conforme o tamanho da amostra analisada. Outro dado informativo obtido no presente estudo foi a média de idade de menopausa precoce entre as portadoras da PM, de 32.8 anos, demonstrando o quão cedo estas mulheres tiveram o seu ciclo reprodutivo interrompido.

No presente estudo, a FXPOI considerada incluiu apenas os casos extremos (de menopausa precoce) e não os outros casos (alteração hormonal, períodos de amenorreia, infertilidade), pois não havia dados de todas as mulheres com relação à dosagem hormonal (níveis de FSH, por exemplo) e dos ciclos menstruais. Portanto, é possível que a incidência de

FXPOI no grupo estudado seja mais alta do que a levantada. Ainda, com relação apenas à menopausa precoce, deve ser levado em conta que no grupo de portadoras da PM deste estudo, há 31 mulheres portadoras da PM que ainda não chegaram aos 40 anos, sendo que uma parcela destas ainda poderá entrar em menopausa até completar esta idade, demonstrando que o índice de 21.95% de frequência de menopausa precoce em portadoras da PM reflete o índice mais real, pois apenas leva em conta as portadoras da PM com menopausa precoce e que atualmente têm mais de 40 anos.

É importante enfatizar às portadoras da PM que tiveram menopausa precoce a importância da realização de exames para avaliar a densidade óssea e outros acompanhamentos, pois a menopausa precoce aumenta a incidência de osteoporose, problemas cardíacos, doenças autoimunes, além da ansiedade e da depressão (SHUSTER et al., 2010).

Embora a menopausa precoce seja um bom indicador de que a mulher carrega o gene pré-mutado, não são detectáveis frequentemente em mulheres mais jovens (menos de 30 anos) e também não ocorrem em todas as portadoras da PM, em média, apenas em 14-20% das mesmas (ALLIGHAM-HAWKINS et al., 1999; VIANNA-MORGANTE et al., 1999; RODRIGUEZ-REVENGA et al., 2009). Neste estudo, apenas uma portadora da PM apresentou menopausa antes dos 30 anos. No entanto, ainda assim, a menopausa precoce é um fenótipo muito importante na identificação das mulheres mais velhas (acima de 30-40 anos), pois caso tenham irmãs mais novas, ou mesmo filhas, podem compartilhar com elas o gene pré-mutado. É aconselhável o teste da PM nas mulheres consanguíneas daquelas que tiveram menopausa precoce, e caso haja resultados positivos, além do aconselhamento genético com relação ao risco de filhos com a SXF, deverá ser feito o aconselhamento sobre os riscos de FXPOI, que incluem: infertilidade, alterações hormonais e menopausa precoce (SPATH et al., 2011; ABRAMS et al., 2012). Caso a mulher deseje engravidar, poderá optar pela seleção de embriões, em que o médico seleciona apenas os oócitos que não têm a PM, impedindo, com isto que a mulher tenha um filho com a SXF (MURRAY et al., 1997).

Não foi encontrada correlação linear entre a idade de menopausa e o número de repetições entre as portadoras da PM ( $r= 0.08$ ; IC [95%]= -0.35, 0.48;  $p= 0.73$ ) e nem correlação para a menopausa precoce ( $r=0.19$ ; IC [95%]= -0.54, 0.76;  $p=0.63$ ). É possível observar, no entanto, que 7 de 9 portadoras da PM com menopausa precoce tinham repetições CGG entre 70 a 100. Isso pode ter ocorrido ao acaso, por se ter uma amostra pequena de

mulheres (n=9) e não se ter mulheres com mais de 100 repetições CGG neste grupo, ou por ser possível a existência de uma correlação não linear entre a idade e a menopausa precoce, como a observada nos trabalhos de Sullivan e colaboradores (2005) e Allen e colaboradores (2007), que mostram que as mulheres que têm menopausa precoce são principalmente aquelas com repetições CGG na faixa intermediária (80-100).

Um segundo fenótipo que diferiu de modo significativo entre os dois grupos foram as dores musculares (38.96% portadoras da PM vs. 20.22% controle;  $p=0.008$ ). As dores musculares eram definidas como dores crônicas e persistentes, sem ter sido consequência do esforço físico. Este resultado foi consistente com o encontrado no estudo de Coffey e colaboradores (2008) e em Leehey e colaboradores (2011), em que as dores musculares se mostraram mais frequentes entre as portadoras da PM do que entre os controles, mas foram estabelecidas em porcentagens menores para ambos os grupos (25.6% portadoras da PM vs. 8.9% controle; 25% portadoras da PM vs. 8.9% controle, respectivamente), valor semelhante também ao encontrado no estudo de Rodriguez-Revenga e colaboradores (2009), com 24.4% de frequência entre portadoras da PM. A diferença na frequência encontrada neste estudo e na verificada na literatura pode ter ocorrido porque as dores musculares eram autorreportadas e não foi exigido diagnóstico médico. Além disso, algumas mulheres podem ter confundido as dores musculares com as dores articulares, devido a sua interpretação, ao responder o questionário. Porém, apesar deste viés, é sugestivo que pré-mutadas têm maior propensão do que mulheres que não são portadoras da PM, de desenvolver esta condição. Baseado na estatística, obteve-se um OR de 2.518, o que significa dizer que as portadoras da PM têm um risco, em média, de ~2.5 vezes maior de apresentar dores musculares do que mulheres que não têm a PM.

Além das dores musculares, também foi perguntado se as mulheres tinham fibromialgia. A maior parte das mulheres citou que têm dores no corpo, principalmente pernas, braços, coluna e nuca, sendo que poucas citaram ter fibromialgia, e isto pode ter sido em decorrência do desconhecimento desta doença entre as mulheres. Neste estudo, quatro mulheres afirmaram ter fibromialgia diagnosticada, sendo duas do grupo de controle (2.25%) e duas do grupo de portadoras da PM (2.6%), ambos os casos adicionados à estatística das dores musculares. Os dados observados no presente estudo com relação à fibromialgia, sem diferenças significativas entre as portadoras da PM e controle concordaram com o que foi observado no trabalho de Hunter e colaboradores (2010). No entanto, percebe-se que, apesar

das portadoras da PM não diferirem dos controles em relação à fibromialgia, as dores musculares são mais frequentes em pré-mutadas e podem ser sinal da fibromialgia ainda não diagnosticada. A fibromialgia é uma síndrome que comporta vários problemas associados, como fadiga crônica e distúrbios no sono, afetando 2 a 4% da população mundial, sendo que a sua prevalência cresce com a idade (LEEHEY et al., 2011). A razão pela qual as mulheres portadoras da PM têm um aumento na propensão de desenvolver fibromialgia é ainda desconhecida, mas pode-se pensar que seja relacionada ao aumento dos níveis de mRNA *FMRI* (WINARNI et al., 2012). Martorell e colaboradores (2012), ao fazerem a triagem genética em 353 mulheres espanholas com fibromialgia, encontraram 4 portadoras da PM, ou seja, uma portadora para cada 88 mulheres com fibromialgia. O autor recomenda em seu estudo que todas as mulheres da população que tenham fibromialgia sejam testadas para a PM, por ter constatado a frequência alta de PM, em relação à observada na população em geral (1 portadora da PM para cada 259 mulheres). Seguindo a mesma linha do autor, embora nesta amostra de mulheres as dores musculares tenham sido citadas ao invés da fibromialgia, seria interessante testar nas mulheres da população que apresentam dores musculares intensas, a presença da PM.

É interessante observar que embora o grupo de portadoras da PM apresentasse maior grau de escolaridade do que o grupo de controles, as portadoras da PM relataram maior frequência de problemas em matemática do que os controles e o resultado foi estatisticamente significativa (44.16% portadoras vs. 29.21% controle;  $p=0.046$ ), indicando que as portadoras da PM, têm, em média, ~1.9 vezes mais chances de apresentar esta dificuldade do que mulheres sem a PM. Este resultado concordou com o observado em Lachiewicz e colaboradores (2006) (21% portadoras da PM vs. 15% controle), apesar dos dados do presente trabalho terem sido baseados apenas nas percepções que cada mulher tinha do seu desempenho e no trabalho de Lachiewicz e colaboradores (2006) tenham sido utilizados testes de matemática para avaliar as mulheres. São necessários estudos mais específicos em relação a esta área com portadoras da PM e controles, porém, é sugestivo que, as portadoras da PM apresentem mais dificuldade em operações matemáticas do que aquelas sem a PM. Uma sugestão para as mulheres que são portadoras da PM e têm filhas ou filhos não afetados, mas que podem ser portadores da PM, além do aconselhamento genético que deverá ser oferecido na idade reprodutiva, seria sugerido que as crianças recebessem na época escolar, aulas de

reforço em matemática ou o auxílio de terapeutas educacionais, para amenizar estes problemas.

As enxaquecas também foram relatadas de modo mais frequente pelas portadoras da PM do que pelo grupo controle (51.95% portadoras da PM vs. 37.08% controle), e mesmo os resultados não diferindo estatisticamente, se aproximaram muito do limiar considerado significativa ( $p=0.054$ ). A enxaqueca é uma desordem neurológica comum na população e que acomete mais mulheres do que homens, e pensa-se que a maior prevalência em mulheres seja relacionada a influências hormonais. A enxaqueca pode ser comum em pessoas que tenham doenças, como depressão, ansiedade, endometriose e hipotireoidismo (PETERLIN et al., 2012). Leehey e colaboradores (2011) descreveram cinco casos clínicos de portadoras da PM em que duas apresentavam enxaquecas, no entanto, são necessários mais estudos para se afirmar se de fato a PM predispõe a mulher a desenvolver esta condição. Smith e colaboradores (2010) verificaram que as enxaquecas eram mais comuns em mães de crianças com SXF ou autismo (sem a PM) do que naquelas que não eram mães de crianças com necessidades especiais. Isto implica em dizer que possivelmente o papel desempenhado pelo estresse, um fator ambiental, possa estar tendo um peso mais forte no desenvolvimento de algumas doenças do que apenas a PM em si (SMITH et al., 2010).

Um dado interessante que surgiu ao longo das entrevistas com as portadoras da PM foram os 3 reportes de artrite reumatoide (AR), que assim como a fibromialgia, são doenças autoimunes. A prevalência da AR neste estudo foi de 3.9% entre as mulheres portadoras da PM, um índice semelhante ao encontrado no trabalho de Winarni e colaboradores (2012) e Hundscheid e colaboradores (2003), com prevalências de 3.8% e 3.3%, respectivamente. No presente estudo, foi verificada apenas uma mulher do grupo de controles com AR (1.4%). Também foram citados por duas portadoras da PM, problemas de intestino irritável, que podem ser de origem autoimune. Uma portadora citou ter diabetes, mas não especificou se era autoimune. Não houve questões que abordassem diretamente outras doenças de etiologia autoimune às mulheres, como o diabetes, o lúpus eritematoso sistêmico e a esclerose múltipla, embora o final do questionário permitisse que estas doenças fossem citadas, caso assim as mulheres o desejassem. Para as mulheres do grupo de controles, apareceram 5 casos de relatos espontâneos de diabetes e um caso de esclerose múltipla. Da mesma forma que ocorreram com as pré-mutadas, também não foi possível saber se os casos de diabetes eram devido à autoimunidade. É importante ressaltar, no entanto, que a literatura sugere que os

problemas autoimunes são mais significativas em mulheres com o diagnóstico da FXTAS (COFFEY et al., 2008; WINARNI et al., 2012) e como não havia neste estudo nenhuma mulher com a FXTAS diagnosticada, é possível que os problemas autoimunes não diferissem entre portadoras da PM e controles. Apesar disto, as doenças autoimunes podem futuramente, ser boas candidatas para estarem presentes nos questionários, cuja finalidade seria de selecionar as mulheres mais indicadas para a realização do teste da PM, mesmo que as candidatas ao exame sejam mulheres mais velhas (WINARNI et al., 2012).

As frequências da hipertensão, de problemas ósseos, câncer e de problemas de tireoide no presente estudo não diferiram de modo significativo entre portadoras da PM e controle, concordando com o que foi estabelecido em Coffey e colaboradores (2008), para portadoras da PM sem FXTAS vs. controle (hipertensão e tireoide) e Hundscheid e colaboradores (2003) (problemas ósseos e câncer).

A correlação linear entre as idades em que as mulheres apresentaram os problemas de tireoide e o número de repetições CGG foi positivamente fraca, mas não chegou ao nível de significância ( $r= 0.26$ ; IC [95%]=  $-0.61, 0.85$ ;  $p= 0.57$ ). Semelhante à menopausa, a maioria das portadoras da PM com repetições na faixa de 60 a 90 CGG tiveram problemas de tireoide. Problemas, como a menopausa precoce e distúrbios na tireoide podem, realmente, serem mais recorrentes em mulheres com repetições na faixa de 60~100, mas são necessários outros estudos, porque não se teve mulheres com repetições acima de 100 para serem feitas comparações.

Esperava-se que a depressão e a ansiedade fossem mais comuns nas portadoras da PM do que nos controles (ROBERTS et al., 2009; HUNTER et al., 2010; LACHIEWICZ et al., 2010), assim como ocorreram com as dores musculares, no entanto, verificou-se no presente estudo que a frequência das mesmas não diferiu nos dois grupos. Pelo fato de não ter sido exigido diagnóstico médico neste questionamento, ou não terem sido excluídas as mulheres que não usam medicamentos para controlar estes problemas, é possível a existência de um viés. Da mesma maneira, tremor, dormência/formigamento nos membros, desmaio, desatenção, isolamento, tonturas, dificuldade de aprendizagem não diferiram entre os grupos. O tremor foi, inclusive, mais frequente em controles do que nas portadoras da PM. Estas declarações apresentavam limitações ao serem avaliadas em ambos os grupos, por apresentarem o mesmo viés da ansiedade e da depressão (não ter sido exigido o diagnóstico). Portanto, o presente estudo não descarta a possibilidade de que estes problemas sejam mais

prevalentes nas portadoras da PM, como a literatura relata (COFFEY et al., 2008; HUNTER et al., 2008a; HUNTER et al., 2008b; SELTZER et al., 2012).

As alterações sanguíneas, problemas renais, crise de ausência, psicose, dificuldade/facilidade em redação, problemas articulares, facilidade em matemática, convulsões, o AVC e infarto não diferiram entre as portadoras da PM e os controles e os relatos dos três últimos foram os menos frequentes de todos os problemas listados neste estudo.

É interessante observar que as portadoras da PM citaram como relatos espontâneos, as alterações hormonais em nível de ovários/útero, com 44.16% de frequência, que incluíam: infertilidade, abortos espontâneos, mioma uterino, endometriose, ovários policísticos, natimortos, gravidez de risco e ressecamento vaginal, sendo as alterações no ciclo menstrual (irregularidades) as mais citadas. Para o grupo de controle, os relatos espontâneos em relação às alterações hormonais em nível de ovários/útero somaram 15.73% e foram claramente mais baixos, mesmo que estes problemas não tenham sido perguntados diretamente às mulheres. Sabe-se que os ciclos menstruais são o resultado de eventos integrados envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-ovários (CARO et al., 2008) e como já é observada na literatura a possibilidade da desregulação deste eixo devido ao excesso de mRNA *FMRI* nas portadoras da PM (LEEHEY et al., 2010), esta poderia ser uma das explicações para a alta taxa de irregularidade menstrual observada nestas mulheres, se constituindo um achado importante para a caracterização do perfil das portadoras da PM.

Foram intrigantes três citações de portadoras da PM que relataram o esfarelamento de um ou mais dentes. O esfarelamento e erosão dos dentes podem ser causados pela ação de ácidos, obtidos na dieta, pelo uso de certos medicamentos e em eventos de regurgitação, especialmente em pessoas que sofrem de refluxo gastroesofágico e bulimia (ALMEIDA E SILVA et al., 2011). No entanto, não foram perguntados especificamente cada um destes problemas para as portadoras da PM e é possível que existam outros fatores relacionados a esta alteração dentária, que podem ser melhor investigados em futuros estudos.

Existe certa inconstância em relação aos estudos em pré-mutadas, em que algumas pesquisas não encontram diferenças na apresentação de doenças físicas/psicológicas entre as portadoras da PM e no grupo de controle (HUNTER et al., 2010). Uma possível explicação para estas observações pode ser devido ao fato de que algumas mulheres pré-mutadas apresentam apenas leves traços de uma ou mais doenças, dificultando assim o diagnóstico

clínico para uma doença específica (SMITH et al., 2010). Um exemplo que ilustra bem este ponto pode ser encontrado no trabalho de Hunter e colaboradores (2008b). A autora e seus colaboradores verificaram que as mulheres com PM apresentam leves sintomas de TDAH, embora não apresentem um nível clínico para serem consideradas como portadoras do TDAH. O mesmo pode ocorrer com outras desordens, como as de cunho neurológico encontradas na FXTAS (tremores, problemas de memória, dormência e formigamento nos membros). Apesar destes sintomas neurológicos observados nas mulheres pré-mutadas serem leves, eles não são considerados clinicamente como FXTAS, e também não levam necessariamente ao desenvolvimento da mesma, porém podem, assim como no mecanismo da FXTAS, estarem relacionados à toxicidade pelo excesso de mRNA (COFFEY et al., 2008; CHONCHAIYA et al., 2010). Outro causador de diferenças entre os resultados em pesquisas de mulheres pré-mutadas podem ser as diferentes médias de idade dos grupos de mulheres (alguns autores realizam estudos com mulheres mais jovens; outros com mulheres mais velhas) e os grupos de mulheres que são recrutadas como controles (SMITH et al., 2010).

É possível apontar algumas limitações neste estudo, como o fato de ter sido utilizada uma amostra pequena de mulheres com PM, que foi gerada pela dificuldade de contatar aquelas que se mudaram ou trocaram o número do telefone. Além disso, foi coletada uma amostra extra de mulheres que não fizeram o exame de PCR para FRAXA (por se recusarem, não aceitarem a condição de portadoras do gene alterado ou desconhecerem a importância do exame), mas que tinham pelo menos um filho com a SXF. Este grupo não fez o exame genético e com isso, não foi possível determinar o número de repetições presente (algumas destas poderiam inclusive, serem portadoras de mais de 100 repetições CGG). O segundo limitante foi que as declarações dadas pelas mulheres eram autorreportadas e algumas não tiveram a avaliação de um especialista no momento da pesquisa. Além disso, para certas doenças, algumas mulheres respondiam “eu não sei se tenho isso”, o que possivelmente influenciou nas análises. Outro viés da pesquisa pode ter sido decorrente da escolaridade: mulheres com menos escolaridade teriam mais dificuldades de entender o que estava sendo perguntado, o que também pode ter influenciado as análises em ambos os grupos, especialmente no grupo de controles. Para maior confiabilidade dos dados, seriam necessárias algumas modificações, como por exemplo: aumentar o número na amostra de mulheres pré-mutadas e controle; o aval de um especialista na identificação das doenças e também que todas as mulheres (tanto do grupo controle quanto pré-mutadas) fizessem o exame de PCR

para FRAXA, para que se evitasse incorporar no grupo dos controles mulheres zona *gray* ou mesmo pré-mutadas, no entanto, estas limitações podem ser superadas em estudos futuros.

Pode-se concluir que a PM do gene *FMRI* não deve ser tratada como única responsável pelo desenvolvimento de doenças nas suas portadoras (HUNTER et al., 2008b). É possível a existência de outros genes (que interagem ou não com *FMRI*) e outros fatores (como o estilo de vida que a mulher leva, por exemplo) que possam influenciar no desenvolvimento destes fenótipos.

Percebe-se que, quando se fazem pesquisas em famílias com a SXF, o número de membros afetados é pequeno em relação ao número de portadores da PM. É importante enfatizar a necessidade da detecção destes portadores, pois são eles que carregam o gene silenciosamente ao longo das gerações. Ainda, segundo Abrams e colaboradores (2012), um bom método de se encontrar portadoras da PM seria realizar nas mulheres da população que estão na fase pré-concepcional o exame genético para a PM ou até mesmo o teste da mutação completa no recém-nascido, pois com isto, seria possível fazer a intervenção (medicamentosa/terapia educacional) de modo mais precoce, o que melhoraria a qualidade de vida destas crianças e dos pais (ABRAMS et al., 2012).

Com base no que foi verificado ser significativo em nossa amostra de portadoras da PM, e com o que já está bem estabelecido na literatura, propõe-se um questionário para triagem de portadoras da PM, para ser aplicado por médicos endocrinologistas, ginecologistas e neurologistas em suas pacientes. Condições como, casos de DI na família/autismo, de tremor/ataxia e FXPOI/menopausa precoce, devem ser incluídas no questionário final, pois já são bem estabelecidas na literatura e caso uma mulher apresente qualquer uma destas citadas, já seria aconselhada a fazer o exame de PCR para FRAXA (MCCKONKIE-ROSELL et al., 2005; LEEHEY et al., 2010). Poderiam ser sugeridas também as alterações em nível de ovário/útero devido à alta frequência observada no presente trabalho em portadoras da PM, além dos outros casos que foram significativos ou ficaram próximos do nível de significância como, dores musculares, dificuldade em matemática e enxaquecas. Este questionário final encontra-se no **Apêndice C**. Pelo verificado, é necessária a realização de pesquisas utilizando o questionário para a validação e estabelecimento do intervalo mínimo e máximo de pontuação para a recomendação do exame.

## 7. CONCLUSÃO

- Este estudo foi o primeiro do estado de Santa Catarina realizado com mulheres portadoras da PM da SXF, em que foram caracterizadas 77 mulheres portadoras da PM e 89 controles, com relação aos aspectos clínicos - presença de doenças, desordens, dificuldades e aptidões.
- Os fenótipos levantados em dados da literatura e sugeridos por pesquisadores para serem perguntados às mulheres no questionário inicial foram: ansiedade, depressão, enxaquecas/dores de cabeça intensas, dores musculares, tremor, fraqueza muscular, dormência ou formigamento nos membros, tonturas, desmaios, desatenção, isolamento, crise de ausência, psicose, alteração dentária, facilidade/dificuldade de aprendizagem e memorização, facilidade/dificuldade em matemática, facilidade/dificuldade em redação, problemas ósseos, problemas renais, problemas articulares, alterações no sangue, câncer, menopausa precoce, problemas de tireoide, hipertensão, convulsões, AVC, infarto e fibromialgia, além de um espaço aberto para incluir outras possíveis condições clínicas.
- Diferiram de modo significativo em relação à frequência obtida pelas portadoras da PM e controles, apresentando-se de modo mais frequentes nas pré-mutadas: dores musculares, menopausa precoce e dificuldades em matemática. As enxaquecas/dores de cabeça intensas se aproximaram do limiar de significância e também foram mais frequentes nas portadoras da PM.
- Não foram observadas diferenças significativas entre as portadoras da PM e controles na maior parte dos fenótipos, contrastando com os estudos realizados em pré-mutadas observados na literatura.
- O índice de menopausa precoce levantado no presente estudo de mulheres portadoras da PM foi um pouco menos elevado do que o estabelecido pela literatura em geral, no entanto, ficou próximo ao estabelecido em um estudo brasileiro.
- As dores musculares, acrescidas aos dados de fibromialgia nas portadoras da PM foram mais altas que as reportadas na literatura.
- A dificuldade na matemática foi alta nas portadoras da PM, mesmo comparando portadoras da PM que tinham maior nível de escolarização que os controles do presente estudo.

- Foram relatados por uma grande percentagem de portadoras da PM alterações hormonais em nível de ovários/útero, acrescentadas como informações adicionais no questionário utilizado na pesquisa.
- Com base no observado neste trabalho e na literatura, é sugerido um questionário final para a triagem de portadoras da PM, que contém os seguintes fenótipos: Casos de deficiência intelectual na família ou autismo, casos de tremor/ataxia, FXPOI, Menopausa precoce, Casos de menopausa precoce na família, Alterações hormonais em nível de ovário/útero, Dores musculares ou fibromialgia, Dificuldade no aprendizado de matemática e Enxaquecas.
- A partir da identificação de portadoras da PM é possível atuar no aconselhamento genético (prevenção do aparecimento e/ou recorrência de casos de DI na família, riscos de FXPOI e FXTAS) tanto da portadora da PM quanto da família.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMS, L. et al. Newborn, Carrier, and Early Childhood Screening Recommendations for Fragile X. **Pediatrics**, v. 130, n.6, Nov., p-1-10. 2012.
- ALLEN, E.G. et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. **Human Reproduction**, v. 22, n.8, June, p. 2142–52. 2007.
- ALLINGHAM-HAWKINS, D.J. et al. Fragile X Premutation Is a Significant Risk Factor for Premature Ovarian Failure: The International Collaborative POF in Fragile X Study—Preliminary Data. **American Journal of Medical Genetics**, v.2, n. 83, Apr., p. 322–25. 1999.
- ALMEIDA E SILVA, J.S. et al Dental erosion: understanding this pervasive condition. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 23, n. 4, June, p.205-216.2011.
- AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS (ACMG). **Technical 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**. 2006 Edition. Disponível em:  
<[http://www.acmg.net/Pages/ACMG\\_Activities/stds-2002/fx.htm](http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/fx.htm)>. Acesso em Abril de 2011.
- AROCENA, D, G. et al. Induction of inclusion formation and disruption of lamin A/C structure by premutation CGG-repeat RNA in human cultured neural cells. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 23, Oct., p. 3661–71. 2005.
- BENNETT, C.E. et al. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, May, p. 1335-38. 2010.
- BUTLER, M.G. et al. A 15-item checklist for screening mentally retarded males for fragile X syndrome. **Clinical Genetics**, v. 39, n. 5, May, p. 347-54. 1991.
- CARO, J.J.; DOMINGUEZ, C.; SHERMAN, S.L. Reproductive health of adolescent girls who carry the FMR1 premutation: expected phenotype based on current knowledge of Fragile X–Associated Primary Ovarian Insufficiency. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1135, n. 1, June, p. 99-111. 2008.
- CHONCHAIYA, W. et al. Clinical involvement in daughters of men with fragile X-associated tremor ataxia syndrome. **Clinical Genetics**, v. 78, n. 1, Mar., p. 38-46, 2010.
- CHRISTOFOLINI, D.M. et al. Clinical checklists in the selection of mentally retarded males for molecular screening of fragile X syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, May, p. 1047-50. 2007.
- COFFEY, S. M. et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. **American Journal of Medical Genetics** part A, v. 146a, n. 8, Mar., p. 1009-16. 2008.

- DOMBROWSKY, C. et al. Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 4, Dec., p. 371-78. 2002.
- FERNANDEZ-CARVAJAL, I. et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 4, July, p.306-10. 2009a.
- FERNANDEZ-CARVAJAL, I. et al. Screening for expanded alleles of the FMR1 gene in blood spots from newborn males in a spanish population. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 4, July, p. 324-328. 2009b.
- FRACKMAN, S. et al. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. **Promega Notes**, n. 65, p. 27-30. 1998.
- 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, Dec., p.1047-58. 1991.
- GARBER, K.B.; VISOOTSAK, J.; WARREN, S.T. Fragile X syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v.16, n. 6, June, p. 666–72. 2008.
- GRECO, C. M. et al. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. **Brain**, v. 125, n. 8, Aug., p.1760–71. 2002.
- HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. **Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research**. 3<sup>rd</sup> edition. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 2002, 540 p.
- HAGERMAN, R.J.; RIVEIRA, S.M.; HAGERMAN, P.J. The fragile X family of disorders: A model for autism and targeted treatments. **Current Pediatric Reviews**, v. 4, n. 1, Feb., p.40–52. 2008.
- HESSL, D. et al. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the Fragile X premutation. **American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)**, v. 139B, Nov., p.115–21. 2005.
- HINDS, H.L. et al. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. **Nature Genetics**, v.3, n. 1, Nov., p. 36-43. 1993.
- HUNDSCHIED, R.D.L. et al. Female carriers of fragile X premutations have no increased risk for additional diseases other than premature ovarian failure. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 117A, n. 1, Feb., p.6-9. 2003.
- HUNTER, J.E. et al. Investigation of phenotypes associated with mood and anxiety among male and female fragile X premutation carriers. **Behavior Genetics**, v. 38, n. 5, Sept., p. 493-02. 2008a.

HUNTER, J.E. et al. No evidence for a difference in neuropsychological profile among carriers and noncarriers of the FMR1 premutation in adults under the age of 50. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 6, Dec., p. 692-702. 2008b.

HUNTER, J.E.; ROHR, J.K.; SHERMAN, S.L. Co-occurring diagnoses among FMR1 premutation allele carriers. **Clinical Genetics**, v. 77, n. 4, Apr., p. 374-81. 2010.

HUNTER, J.E. et al. Capturing the fragile X premutation phenotypes: a collaborative effort across multiple cohorts. **Neuropsychology**, v. 26, n. 2, Jan. p. 156-64. 2012.

JIN, P.; WARREN, S.T. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 6, Apr., p. 901-908. 2000.

JOHNSTON, C. et al. Neurobehavioral phenotype in carriers of the fragile X premutation. **American Journal of Medical Genetics**, v. 103, n. 4, Nov., p.314-19. 2001.

LACHIEWICZ, A.M. et al. Arithmetic difficulties in females with the fragile X premutation. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140a, n. 7, Apr., p. 665–72. 2006.

LACHIEWICZ, A.M. et al. Indicators of anxiety and depression in women with the fragile X premutation: assessment of a clinical sample. **Journal of Intellectual Disability Research**, v. 54, n. 7, July, p. 597–10. 2010.

LEEHEY, M.A. et al. Clinical neurological phenotype of FXTAS. *In*: TASSONE, F.; BERRY-KRAVIS, E.M. **The fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS)**. New York: Springer, 2010, p.1-16.

LEEHEY, M.A. et al. Fibromyalgia in fragile X mental retardation 1 gene premutation carriers. **Rheumatology**, v. 50, n. 12, Dec., p. 2233-6. 2011.

LEVIN, J.; FOX, J.A. **Estatística para Ciências Humanas**. 9ª edição. São Paulo: Pearson, 2004, 497 p.

LIU, Y. et al. Fragile X- associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) in grey zone carriers. **Clinical genetics**, Sept. 2012.

LUBS, H.A. A marker X chromosome. **American Journal of Human Genetics**, v. 21, n.3, May, p. 231-44. 1969.

MARTORELL, L. et al. Screening for the presence of FMR1 premutation alleles in a Spanish population with fibromyalgia. **Clinical Rheumatology**, Aug. 2012.

MCCONKIE-ROSELL, A. et al. Genetic counseling for fragile X syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. **Journal of counseling**, v.14, n.4, Aug., p. 249-69. 2005.

MCMURRAY, C.T. Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 12, Dec., p. 786-99. 2010.

- MURRAY, J. et al. Screening for fragile X syndrome. **Health Technology Assessment**, v. 1, n. 4, 1997, 71 p.
- NOLIN, S.L. et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **The American Journal of Human Genetic**, v. 72, n. 2, Jan., p. 454–64. 2003.
- NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F.; **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 640p.
- PETERLIN, B.L.; CALHOUN, A.H.; BALZAC, F. Men, women, and migraine: The role of sex, hormones, obesity, and PTSD. **The Journal of family practice**, v. 61, n. 4, Apr., p-7-11. 2012.
- QUEIROZ, M. A. **Avaliação de pré-mutação por PCR na síndrome do X-frágil**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.
- RECASENS, M.M. et al. Estudio genético y molecular de 85 familias afectas del síndrome del cromossoma X frágil. **Anales españoles de pediatría**, v. 44, n.3, Mar, p. 250-256. 1996.
- REYNIERS, E. *et al.* The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. **Nature Genetics**, v.4, n. 2, June, p. 143-6. 1993.
- ROBERTS, J.E. et al. Mood and anxiety disorders in females with the FMR1 premutation. **American Journal of Medical Genetics Part B**, v. 150B, Jan., p.130–39. 2009.
- RODRIGUEIRO, D. A. **Síndrome do cromossomo X-frágil: análise intrafamiliar das características clínicas, psicológicas fonoaudiológicas e moleculares**. 2006. 163 f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2006.
- RODRIGUEZ-REVENGA, L. et al. Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n.10, Apr., p.1359 – 62. 2009.
- ROUSSEAU, F. et al. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene— and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 57, n. 5, Nov., p.1006– 18. 1995.
- 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. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 5, Nov., p. 605-12. 2005.
- SCHMIDT, C.O.; KOHLMANN, T. When to use the odds ratio or the relative risk. **International Journal of Public Health**, v. 53, n. 3, June, p. 165-167. 2008.

SELLIER, C. et al. Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 29, n. 7, Apr., p. 1248-61. 2010.

SELTZER, M. M. et al. Prevalence of CGG expansions of the FMR1 gene in a US population-based sample. **American Journal of Medical Genetics Part B**, v. 159B, Apr., p. 589–597. 2012.

SHERMAN, S. L. et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. **Human Genetics**, v. 69, n. 4, May, p. 289-99. 1985.

SHUSTER, L.T. et al. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. **Maturitas**, v. 65, n. 2, Feb., p. 161-67. 2010.

SMITH, L.E.; SELTZER, M.M.; GREENBERG, J.S. Daily health symptoms of mothers of adolescents and adults with fragile X syndrome and mothers of adolescents and adults with autism spectrum disorder. **Journal autism development disorders**, v. 40, n. 2, Feb., p.167-78. 2010.

SNOW, K. et al. Analysis of a CGG sequence at the FMR-I locus in fragile X families and in the general population. **American Journal of Human Genetics**, v. 53, n. 6, Dec., p.1217-28. 1993.

SPATH, M. et al. Predictors and risk model development for menopausal age in fragile x premutation carriers. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 7, July, p. 643-50. 2011.

SULLIVAN, A.K. et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. **Human Reproduction**, v. 20, n. 2, Feb., p. 402-12. 2005.

TASSONE, F.; HAGERMAN, R. The Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome. *In*: DENMAN, R. B. **Modeling Fragile X Syndrome**. New York: Springer, 2012, p. 337-57.

TOLEDANO-ALHADEF, H. et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, n.2, Aug., p. 351–60. 2001.

TURNER, G. et al. Prevalence of fragile X syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v.64, n. 1, July, p.196-97.1996.

VERKERK, A.J.M.H. et al. Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, Cambridge, v.65, n. 5, May, p.905-914, 1991.

VIANNA-MORGANTE, A.M. et al. Premature ovarian failure (POF) in brazilian fragile x carriers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, May, p. 471-474.1999.

WILLEMSSEN, R.; LEVENGA, J.; OOSTRA, B.B. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. **Clinical Genetics**, v. 80, n. 3, Sept., p. 214-25. 2011.

WINARNI, T.I. et al. Immune-mediated disorders among women carriers of fragile X premutation alleles. **American Human of Medical Genetics Part A**, Aug., p. 1-9. 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. 14, n. 8, Aug., p. 729-36. 2012.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA**

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, Daiane de Andrade, aluna do curso de Ciências Biológicas pela UFSC, e realizarei entre 2011 e 2012 uma pesquisa intitulada “**Fenótipos em portadoras brasileiras da pré-mutação da Síndrome do X-Frágil**”, sob a orientação da professora Dra. Angelica Francesca Maris e coorientação da Ma. Ingrid Tremel Barbatto. Para a realização desta pesquisa será necessária a aplicação de um questionário abordando a presença de doenças que podem estar relacionadas à pré-mutação da síndrome do X-frágil, em um grupo de mulheres com pré-mutação já diagnosticada pelo Laboratório de Genética Humana Neurogene/Florianópolis e em controles (mulheres sem casos de deficiência intelectual na família). O objetivo da pesquisa é verificar se as desordens presentes em mulheres com a pré-mutação de nossa pesquisa concordam com os dados que já são conhecidos, mas também vamos tentar descobrir se existem outros problemas que são mais frequentes em quem tem a pré-mutação comparando com a população em geral. Para a realização da pesquisa, peço sua colaboração e autorização para verificar possíveis prontuários médicos e outras informações clínicas – que você é livre para mostrar ou não mostrar.

#### **Informações**

- Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para pré-diagnóstico em portadoras de pré-mutação X-frágil, beneficiando famílias;
- Prejuízos não são esperados;
- Serão analisados dados do prontuário e dados clínicos que existirem;
- Aqueles que participarem da pesquisa poderão a qualquer momento interrompê-la (somente terá que se comunicar comigo, com a Dra. Angelica ou a Dra. Ingrid por telefone, carta ou e-mail);
- Esta avaliação não terá custo para os participantes;
- O pesquisador se compromete a respeitar a privacidade dos sujeitos da pesquisa, quando solicitado pela família, não expondo imagem, dados de prontuário, questionário ou qualquer ponto considerado privado;
- A pesquisa será confidencial no que diz respeito a identificação das participantes e seu nome ou o de sua família não será divulgado em qualquer publicação decorrente desta pesquisa.

Pesquisadora: Daiane de Andrade  
e-mail: [daiane.a.89@gmail.com](mailto:daiane.a.89@gmail.com)  
CEP: 88107-362

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Angelica Francesca Maris  
Fone: (48) 3721-9887  
e-mail: [afmaris@gmail.com](mailto:afmaris@gmail.com)

Co-orientadora: Ma. Ingrid Tremel Barbato  
Telefone: Fone/Fax: (48) 3223-0229  
e-mail: [labneurogene@yahoo.com.br](mailto:labneurogene@yahoo.com.br)

### **Declaração de Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecida sobre a pesquisa “Fenótipos em portadoras brasileiras da pré-mutação da síndrome do X-Frágil”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da pesquisa, sendo eu contatado para fornecer nova autorização caso forem realizadas novas pesquisas não mencionadas neste projeto.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG e/ou CPF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO INICIAL

## QUESTIONÁRIO

Data: \_/\_/ \_

**Dados pessoais**

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

**Escolaridade:** Até o segundo grau  Superior completo ou mais**Ascendência:** europeia  africana  asiática  indígena**Cor da pele:** branca  negra  amarela  parda**Casos de Deficiência Intelectual na família?**  sim  não

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

**✓ Assinale abaixo se tem ou já teve algumas destas condições:**

- Depressão
- Ansiedade
- Não gosta de sair, se isola das pessoas
- Dificuldade de aprendizagem e memorização
- Facilidade de aprendizagem e memorização
- Desatenção
- Dificuldade em matemática
- Facilidade em matemática
- Dificuldade em redação
- Facilidade em redação
- Tremor
- Dormência e/ou formigamento
- Dores musculares

- ( ) Fibromialgia
- ( ) Tonturas
- ( ) Desmaios
- ( ) Crise de ausência
- ( ) Psicose
- ( ) Convulsões
- ( ) AVC (isquêmico ou hemorrágico)
- ( ) Fraqueza muscular
- ( ) Hipertensão
- ( ) Menopausa precoce
- ( ) Problemas de tireoide (especificar)
- ( ) Câncer
- ( ) Problemas renais (especificar)
- ( ) Problemas dentários (especificar)
- ( ) Problemas ósseos (especificar)
- ( ) Problemas articulares (especificar)
- ( ) Alterações no sangue (especificar)
- ( ) Infarto
- ( ) Dores de cabeça intensas/enxaquecas

Outros problemas?

---

## APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO FINAL

**SUGESTÃO DE QUESTIONÁRIO A SER VALIDADO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORAS DA PRÉ-MUTAÇÃO****(Ideal para ser aplicado com mulheres acima de 30 anos)**

Nome da paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Marque o que você tem ou já teve em relação ao que está listado abaixo.

- Casos de deficiência intelectual na família ou autismo
- Casos de tremor/ataxia na família
- FXPOI
- Menopausa precoce
- Casos de menopausa precoce na família
- Alterações hormonais em nível de ovário/útero
  - Menstruações irregulares, abortos, ovários policísticos, infertilidade, mioma, natimortos
- Dores musculares ou fibromialgia
- Dificuldade no aprendizado de matemática
- Enxaquecas

Pontuação final: