

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

# **Insuficiência ovárica primária associada à síndrome X frágil: implicações na reprodução e no aconselhamento genético**

Maria Luísa Sousa Silva Mendes

**M**

**2021**



# **Insuficiência ovárica primária associada à síndrome X frágil: implicações na reprodução e no aconselhamento genético**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

## **Maria Luísa Sousa Silva Mendes**

Aluna do 6º ano profissionalizante de Mestrado Integrado em Medicina

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Endereço: Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº228, 4050-313 Porto

Endereço eletrónico: up201505442@up.pt

## **Orientador:** Drª Sandra Cristina Lopes Vilar Aguiar Soares

Colaboradora externa do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Assistente Hospitalar de Ginecologia e Obstetrícia, Centro Materno Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto

Endereço: sandracristina.soares@gmail.com

## **Coorientador:** Prof. Doutor Luís Guedes-Martins

Prof. Auxiliar Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Assistente Hospitalar de Ginecologia e Obstetrícia, Centro Materno Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto

Endereço: luis.guedes.martins@gmail.com

**Maio de 2021**

Porto, maio de 2021

MARICI LUISCI MENDES

---

(Assinatura da estudante)

Cláudia Cristina Lopes Vilela Aguiar Soares

---

(Assinatura da orientadora)

Luís Guedes Martins

---

(Assinatura do coorientador)

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup> Sandra Soares por ter aceite orientar esta dissertação e pela disponibilidade ao longo de todo o processo. Ao Professor Doutor Luís Guedes-Martins pela orientação, espírito crítico e ajuda indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, ao Francisco, família e amigos pelo apoio incondicional e segurança que me transmitiram ao longo de todo o percurso. À minha tia Teresa pelo especial contributo nesta dissertação.

## Resumo

O gene *fragile X mental retardation 1* (FMR1) localizado no braço longo do cromossoma X apresenta, em condições normais, uma região 5' não traduzida com menos de 45 sequências citosina-guanina-guanina (CGG). A forma alélica de pré-mutação pode conter 55 a 200 repetições de CGG e caracteriza-se por níveis normais ou baixos da proteína *Fragile X mental retardation* (FMRP). Uma ampla variedade de distúrbios tem sido associada ao estado de pré-mutação, entre os quais, a Síndrome de tremor-ataxia associada ao X frágil (FXTAS) e a Insuficiência ovárica primária associada à Síndrome X frágil (FXPOI).

A Insuficiência ovárica primária (IOP), caracteriza-se pela existência de uma alteração primária do ovário que desencadeia uma disfunção reprodutiva e endócrina em mulheres com idade inferior a 40 anos. A pré-mutação no gene FMR1 é uma das suas principais causas hereditárias.

Do ponto de vista reprodutivo, a identificação da pré-mutação FMR1 antes da manifestação de sinais ou sintomas de insuficiência ovárica primária permite que as mulheres tenham maior poder de escolha relativamente à sua reprodução.

Os alelos pré-mutados são instáveis e, por isso, suscetíveis de expansão quando transmitidos à geração seguinte, apresentando um risco de evolução para mutação completa. A expansão para um número superior a 200 repetições resulta no silenciamento do gene FMR1, culminando na ausência da produção da proteína FMRP, o que define a Síndrome do X frágil (SXF). Esta representa a causa mais comum de deficiência intelectual hereditária em homens e constitui o principal defeito monogénico associado ao autismo.

O aconselhamento genético deve ser sugerido a todos os indivíduos com valores de repetições dentro da faixa intermédia, e a portadores de pré-mutação e mutação completa. Este deve incluir a explicação da fisiopatologia e as consequências diretas para o paciente, bem como as implicações para a descendência futura.

Com o objetivo de reunir o conhecimento científico atual sobre o espectro de doenças associadas à Síndrome do X frágil, em particular, a insuficiência ovárica primária e suas potenciais consequências, foi realizada a pesquisa sistemática na plataforma *PubMed*, utilizando os termos MeSH “Fragile X Syndrome”, “Primary Ovarian Insufficiency”, “Fragile X Mental Retardation

Protein”, “Fragile X Tremor Ataxia Syndrome”, “Prenatal diagnosis”, “Preimplantation diagnosis” e “Gene editing” isolados ou combinados entre si.

**Palavras-chave:** Fragile X Syndrome | Primary Ovarian Insufficiency | Fragile X Mental Retardation Protein | Fragile X Tremor Ataxia Syndrome | Prenatal diagnosis | Preimplantation diagnosis | Gene editing

## Abstract

The *fragile X mental retardation 1* (FMR1) gene, located on the long arm of the X chromosome has, under normal conditions, a 5' untranslated region with less than 45 cytosine-guanine-guanine (CGG) sequences. Premutation alleles can contain 55 to 200 repetitions of CGG and are characterized by normal or low levels of the fragile X mental retardation protein (FMRP). A wide variety of disorders have been associated with the premutation state, including Fragile X-associated tremor-ataxia syndrome (FXTAS) and Fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI).

Primary ovarian insufficiency is characterized by the existence of a primary change in the ovary that triggers reproductive and endocrine dysfunction in women under the age of 40. The premutation in the FMR1 gene is one of the main inherited causes.

From the reproductive point of view, the identification of the FMR1 premutation prior to the manifestation of signs or symptoms of primary ovarian insufficiency allows women to have greater power of choice regarding their reproduction options.

Premutation alleles are unstable and, therefore, susceptible to expansion when transmitted to the next generation, presenting a risk of evolving to complete mutation. Expansion to more than 200 repetitions results in the silencing of the FMR1 gene, ending up in the absence of FMRP protein, which defines the Fragile X syndrome. This represents the most common cause of hereditary intellectual disability in men and it is the main monogenic defect associated with autism.

Genetic counseling should be offered to all individuals with intermediate results and to carriers of premutation or full mutation. It shall include the explanation of the pathophysiology, and the direct consequences for the patient, and also for the future offspring.

In order to gather current scientific knowledge on the spectrum of diseases associated with Fragile X Syndrome, in particular, primary ovarian insufficiency and its possible consequences, a systematic search was carried out on the PubMed platform, using the MeSH terms “Fragile X Syndrome”, “Primary Ovarian Insufficiency”, “Fragile Mental Retardation Protein”, “Fragile X Tremor Ataxia Syndrome”, “Prenatal Diagnosis”, “Preimplantation diagnosis” and “Gene editing” isolated or combined between itself.

**Keywords:** Fragile X Syndrome | Primary Ovarian Insufficiency | Fragile X Mental Retardation Protein | Fragile X Tremor Ataxia Syndrome | Prenatal diagnosis | Preimplantation diagnosis | Gene editing



## Lista de abreviaturas

|          |                                                                                                                          |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACOG     | <i>American College of Obstetrics and Gynecology</i>                                                                     |
| ACMGG    | <i>American College of Medical Genetics and Genomic</i>                                                                  |
| ADO      | <i>Allele dropout</i>                                                                                                    |
| Beta-HCG | Gonadotropina coriônica humana                                                                                           |
| CRISPR   | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>                                                         |
| FIV      | Fertilização <i>in vitro</i>                                                                                             |
| FMRP     | <i>Fragile X mental retardation protein</i>                                                                              |
| FMRpolyG | <i>Fragile X polyglycine</i>                                                                                             |
| FMR1     | <i>Fragile X mental retardation 1</i>                                                                                    |
| FSH      | Hormona folículo-estimulante                                                                                             |
| FXDOR    | <i>Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve</i> / Diminuição da reserva ovárica associada à síndrome X frágil     |
| FXTAS    | <i>Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome</i> / Síndrome do tremor-ataxia associada ao X frágil                     |
| FXPOI    | <i>Fragile X-Associated primary ovarian insufficiency</i> / Insuficiência ovárica primária associada à síndrome X frágil |
| HAM      | Hormona anti-mülleriana                                                                                                  |
| hnRNP    | <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>                                                                          |
| IOP      | Insuficiência ovárica primária                                                                                           |
| MCP      | <i>Middle cerebellar peduncle</i> / Pedúnculo cerebelar médio                                                            |
| MS-MLPA  | <i>Methylation-Specific Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification assay</i>                                       |
| PCR      | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                                                                                         |
| RMN      | Ressonância magnética nuclear                                                                                            |
| STR      | <i>Short tandem repeats</i>                                                                                              |
| SXF      | Síndrome do X frágil                                                                                                     |
| TRH      | Terapia de reposição hormonal                                                                                            |

## ÍNDICE

|                                                                                 |             |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Agradecimentos.....</b>                                                      | <b>i</b>    |
| <b>Resumo .....</b>                                                             | <b>ii</b>   |
| <b>Abstract .....</b>                                                           | <b>iv</b>   |
| <b>Lista de abreviaturas.....</b>                                               | <b>vi</b>   |
| <b>Lista de Figuras .....</b>                                                   | <b>viii</b> |
| <b>Lista de Tabelas.....</b>                                                    | <b>viii</b> |
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>                                                      | <b>1</b>    |
| <b>II. OBJETIVOS.....</b>                                                       | <b>3</b>    |
| <b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                            | <b>3</b>    |
| <b>IV. EPIDEMIOLOGIA.....</b>                                                   | <b>4</b>    |
| <b>V. INSUFICIÊNCIA OVÁRICA PRIMÁRIA.....</b>                                   | <b>6</b>    |
| Apresentação clínica .....                                                      | 6           |
| Diagnóstico e investigação.....                                                 | 6           |
| <b>VI. INSUFICIÊNCIA OVÁRICA PRIMÁRIA ASSOCIADA À SÍNDROME X FRÁGIL.....</b>    | <b>8</b>    |
| Fisiopatologia .....                                                            | 8           |
| Implicações reprodutivas.....                                                   | 10          |
| Estratégia terapêutica.....                                                     | 12          |
| Suporte emocional .....                                                         | 12          |
| Terapia de reposição hormonal .....                                             | 12          |
| Modificação do estilo de vida .....                                             | 13          |
| Contraceção .....                                                               | 13          |
| <b>VII. PRÉ-MUTAÇÃO E SÍNDROME DO TREMOR-ATAXIA ASSOCIADA AO X FRÁGIL .....</b> | <b>14</b>   |
| <b>VIII. EXPANSÃO ALÉLICA E SÍNDROME DO X FRÁGIL .....</b>                      | <b>16</b>   |
| <b>IX. RASTREIO E DIAGNÓSTICO DE PRÉ-MUTAÇÃO.....</b>                           | <b>18</b>   |
| <b>X. ACONSELHAMENTO GENÉTICO .....</b>                                         | <b>20</b>   |
| Teste genético pré implantação.....                                             | 20          |
| Diagnóstico pré-natal.....                                                      | 22          |
| <b>XI. CONCLUSÃO .....</b>                                                      | <b>24</b>   |
| <b>XII. ANEXOS.....</b>                                                         | <b>26</b>   |
| <b>XIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                 | <b>31</b>   |

## **Lista de Figuras**

|                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Ilustração dos padrões de expressão do gene FMR1 nos indivíduos com alelos normais, pré-mutação e mutação completa. .... | 26 |
| <b>Figura 2</b> - Ilustração dos mecanismos fisiopatológicos da FXTAS. ....                                                                | 27 |
| <b>Figura 3</b> - Esquema dos antecedentes familiares que sugerem doenças associadas ao X frágil. ....                                     | 28 |

## **Lista de Tabelas**

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela I</b> - Correspondência entre as formas alélicas do gene FMR1 e o número de repetições do trinucleotídeo CGG. .... | 29 |
| <b>Tabela II</b> - Comparação entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico de pré-mutação e mutação completa. ....        | 30 |

## I. INTRODUÇÃO

O gene *fragile X mental retardation 1* (FMR1) possui a particularidade de estar envolvido em três síndromes com características clínicas distintas (Figura 1), nomeadamente a Síndrome do X frágil (SXF), a Síndrome tremor-ataxia associada ao X frágil (FXTAS) e a Insuficiência ovárica primária associada à síndrome X frágil (FXPOI).<sup>1</sup> O *American College of Obstetrics and Gynecology* (ACOG) e o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMGG) definem quatro formas alélicas distintas consoante o número de repetições do trinucleotídeo citosina-guanina-guanina (CGG) ao nível da região 5' não traduzida do gene FMR1. Assim, estabeleceram-se as seguintes designações: normal (5-44 repetições), intermédia (45-54 repetições), pré-mutação (55-200 repetições) e mutação completa (> 200 repetições) (Tabela I).<sup>2,3</sup>

A presença de um número superior a 200 repetições resulta na hipermetilação dos resíduos de citosina da própria repetição e da ilha CpG da região promotora a montante, com consequente silenciamento génico e ausência da proteína *Fragile X mental retardation* (FMRP).<sup>4</sup> Estas alterações relativas à mutação completa afetam a plasticidade sináptica cerebral e estão na origem da deficiência intelectual associada à Síndrome do X frágil.<sup>2,5,6</sup>

Por outro lado, nos portadores da pré-mutação (55–200 repetições) não há silenciamento do gene FMR1. Nestes casos, ocorre um aumento da transcrição do gene FMR1 com redução da translação resultando em níveis normais ou baixos da proteína FMRP.<sup>2</sup>

Os distúrbios associados aos portadores de pré-mutação incluem Síndrome de tremor-ataxia associada ao X frágil (FXTAS), predominantemente em homens, e Insuficiência ovárica primária associada à síndrome X frágil (FXPOI), em mulheres.<sup>7</sup> As semelhanças moleculares dos dois distúrbios, nomeadamente o excesso de FMR1 e inclusões intranucleares, sugerem a presença de mecanismos moleculares comuns subjacentes a FXTAS e FXPOI.<sup>5,8</sup>

A Insuficiência ovárica primária (IOP), também designada por Insuficiência Ovária Prematura, é definida como uma disfunção ovárica em mulheres com idade inferior a 40 anos. Deve ser considerada como um dos diagnósticos diferenciais em qualquer mulher em idade reprodutiva que se apresente com ciclos menstruais irregulares ou infertilidade.<sup>9</sup> Caracteriza-se por hipogonadismo hipergonadotrófico e, como tal, associa-se a hipoestrogenismo e perda de folículos, resultando em irregularidades menstruais, infertilidade e diminuição da qualidade de vida.<sup>10</sup> A pré-

mutação no gene FMR1 é responsável por 2-11% dos casos de insuficiência ovárica primária, sendo, por isso, uma das suas principais causas hereditárias.<sup>9,11,12</sup> O termo FXPOI foi introduzido para descrever qualquer grau de IOP atribuível ao gene FMR1.<sup>13</sup>

## II. OBJETIVOS

Revisão bibliográfica da literatura, elaborada com o objetivo de reunir o conhecimento científico atual sobre o espectro de doenças associadas à SXF com particular relevância na Insuficiência Ovárica Primária associada à Síndrome do X frágil. Serão realçadas as suas potenciais consequências para a mulher em idade reprodutiva e para a descendência futura e, como tal, a relevância do aconselhamento genético nestas situações.

## III. MATERIAL E MÉTODOS

A presente revisão foi realizada com recurso às plataformas de pesquisa *PubMed*, utilizando as seguintes combinações de termos MeSH: “Fragile X Syndrome” e “Primary Ovarian Insufficiency”; “Fragile X Mental Retardation Protein” e “Primary Ovarian Insufficiency”; “Fragile X Syndrome” e “Prenatal diagnosis”; “Fragile X Syndrome” e “Preimplantation diagnosis”; “Fragile X Syndrome” e “Gene editing”; e “Fragile X Tremor Ataxia Syndrome”. Adicionalmente foram pesquisados títulos que incluíssem “Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency” ou “Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve”. Foram incluídos artigos científicos no âmbito do tema da dissertação, restringindo a janela temporal entre 1995 e 2021 e às línguas inglesa e espanhola. Consideraram-se os seguintes critérios de inclusão: artigos de revisão bibliográfica, meta-análises, estudos observacionais e *case reports*. Foram priorizados os artigos originais e excluídos, após análise, os artigos duplicados.

Da pesquisa inicial resultaram 371 artigos. Com base nos resultados obtidos foram analisados os títulos e respetivos resumos, de modo a rastrear a sua relevância para o tópico em questão.

Com os critérios acima referidos foram selecionados 104 artigos para a realização da referida revisão bibliográfica. Adicionalmente foram consultadas as *guidelines* da *European Society of Human Reproduction and Embryology* e do *American College of Obstetricians and Gynecologists*, bem como o consenso do *Fragile X Clinical & Research Consortium*.

#### IV. EPIDEMIOLOGIA

A pré-mutação FMR1 é uma causa comprovada de insuficiência ovárica primária. A prevalência da pré-mutação na população é de 1:150 - 300 mulheres. Existe variabilidade geográfica, com variações étnicas e raciais, com o máximo de prevalência na Colômbia, onde a pré-mutação atinge 1 em cada 100 mulheres e, o mínimo, no Japão afetando 1 em cada 1674 mulheres.<sup>3</sup> Um estudo nos Estados Unidos, que incluía indivíduos de diferentes raças e etnias, revelou uma maior frequência de alelos pré-mutados na população afroamericana e branca comparativamente aos asiáticos. Embora seja consistente com estudos prévios, os resultados não foram estatisticamente significativos pelo pequeno tamanho da amostra.<sup>14</sup>

Tendo em conta que a insuficiência ovárica primária apresenta uma incidência de 1%<sup>10</sup> na população e de 20% nas mulheres com pré-mutação<sup>15,16</sup>, conclui-se que o risco nestas mulheres é 20 vezes superior.<sup>9</sup> Adicionalmente, as mulheres com pré-mutação atingem a menopausa, em média, 5 anos mais cedo que as mulheres saudáveis e cerca de 3% têm a última menstruação antes dos 29 anos.<sup>17-19</sup> Importa diferenciar as duas entidades, já que, enquanto a menopausa assinala o fim da fase reprodutiva da mulher, na insuficiência ovárica primária pode haver função ovárica residual após o diagnóstico, manifestando-se de forma imprevisível e/ou intermitente. Esta característica levou à alteração da designação de falência ovárica primária para IOP, dado que a terminologia anterior sugeria uma cessação definitiva da função ovárica.<sup>20,21</sup> Apesar da consequência mais significativa e imediata da insuficiência ovárica primária ser a redução da fertilidade, 5-10% das mulheres com IOP<sup>9</sup> e 12,6% das mulheres com FXPOI conceberam espontaneamente sem qualquer intervenção médica, o que apoia a hipótese de haver função ovárica residual ou erro no diagnóstico inicial.<sup>11</sup>

O surgimento da Insuficiência ovárica primária associada à Síndrome X frágil é influenciado por três fatores: tamanho da repetição, antecedentes genéticos e tabagismo. Relativamente ao primeiro fator, existe uma relação não linear entre o número de repetições CGG e o risco de IOP<sup>17,22-25</sup>, irregularidade menstrual e infertilidade.<sup>22</sup> Dentro da faixa da pré-mutação, as portadoras com 80-99 repetições têm maior risco de FXPOI e infertilidade quando comparadas com portadoras com 55-79 repetições e com mais de 100 repetições.<sup>22</sup> A associação entre as expansões na faixa intermédia e o risco de IOP não está esclarecido, dada a existência de estudos com resultados discrepantes.<sup>26-30</sup> Os antecedentes genéticos também apresentam um papel importante, dado que o risco de FXPOI está aumentado em mulheres com história familiar de menopausa precoce<sup>31</sup> ou IOP.<sup>32</sup> Um estudo reporta o caso de uma família, na qual seis irmãs portadoras de pré-mutação,

foram diagnosticadas com IOP.<sup>33</sup> O tabagismo, que constitui um fator de risco modificável, favorece o surgimento de menopausa em idade mais precoce em mulheres com e sem pré-mutação, pelo que deve ser identificado durante a entrevista clínica.<sup>9,22</sup>



## V. INSUFICIÊNCIA OVÁRICA PRIMÁRIA

### **Apresentação clínica**

A insuficiência ovárica primária apresenta-se frequentemente com sintomas típicos da menopausa, por vezes precedidos por alterações no ciclo menstrual. Ainda que o surgimento de IOP seja raro na adolescência, para o seu correto diagnóstico é necessário um elevado índice de suspeição, já que por vezes as irregularidades menstruais são entendidas como normais nesta faixa etária.<sup>20</sup> Estima-se que 3% das adolescentes com pré-mutação experienciem alterações do ciclo menstrual, nomeadamente ciclos curtos ou irregulares.<sup>13,34</sup>

A deficiência de estrogénio associa-se a afrontamentos, suores noturnos e sintomas vaginais como secura e dispareunia, que podem interferir significativamente na qualidade de vida das mulheres. Outros sintomas como perturbação do humor, défice de concentração, alteração da frequência urinária, diminuição da libido e falta de energia também podem estar presentes. A severidade e periodicidade dos sintomas referidos pode variar, refletindo as flutuações na atividade ovárica associadas ao início espontâneo da IOP.

Além do impacto a curto prazo, as mulheres diagnosticadas com IOP têm maior morbidade e mortalidade a longo prazo, dado o maior risco cardiovascular e redução da densidade mineral óssea que pode levar a osteoporose.<sup>10,35</sup>

### **Diagnóstico e investigação**

Os critérios para diagnóstico de insuficiência ovárica primária incluem irregularidades menstruais (oligomenorreia ou amenorreia), durante pelo menos quatro meses, e dois registos de níveis elevados de hormona folículo-estimulante (FSH), na faixa de menopausa, com pelo menos um mês de intervalo, em mulheres com idade inferior a 40 anos.<sup>9,10</sup>

Após a exclusão de gravidez, através do doseamento de gonadotrofina coriónica humana (beta-HCG), devem ser avaliadas a função tiroideia e os níveis de prolactina, já que doenças endócrinas podem cursar com anomalias menstruais.<sup>10</sup>

Os níveis de FSH são o *gold standard* para o estabelecimento do diagnóstico de IOP. O doseamento de hormona anti-mülleriana (HAM), um marcador direto da reserva ovárica<sup>20</sup>, pode

ser realizado, devendo ser interpretado apenas em conjunto com os níveis de FSH e estrogénios. Estudos revelam que são encontrados níveis mais baixos de HAM em mulheres com IOP ou baixa reserva ovárica. No entanto, as mulheres com valores baixos de HAM mas com ciclos menstruais regulares não devem ser diagnosticadas com IOP.<sup>10</sup>

Após o diagnóstico de IOP, importa determinar a sua etiologia, pesquisando anomalias cromossómicas e/ou genéticas, doenças autoimunes, doenças infecciosas e fatores iatrogénicos como cirurgias, radioterapia e quimioterapia. Na maioria dos casos o fator causal permanece desconhecido, classificando-se a IOP como idiopática.<sup>10,20,36</sup>

Dada a alta prevalência de anomalias cromossómicas nestes casos, todas as mulheres diagnosticadas com IOP devem efetuar um cariótipo em sangue periférico. A análise do gene FMR1, está indicada em todas as mulheres com IOP após explicação das implicações associadas ao diagnóstico de pré-mutação. Sugere-se igualmente a pesquisa de anticorpos anti 21-hidroxilase ou adrenocorticais e antitiroideus em mulheres com IOP de causa desconhecida ou quando há suspeita de doença autoimune.<sup>10</sup>

A ecografia e a biópsia ovárica não são recomendadas por rotina para a determinação da etiologia. Como a função ovárica pode ser flutuante em mulheres com IOP, pode ser visualizada atividade folicular, não distinguindo IOP de outros diagnósticos.<sup>10</sup>

## VI. INSUFICIÊNCIA OVÁRICA PRIMÁRIA ASSOCIADA À SÍNDROME X FRÁGIL

### Fisiopatologia

O mecanismo fisiopatológico mais consensual relativamente à FXPOI é uma função anormal dos folículos e não uma diminuição dos folículos primordiais.<sup>37,38</sup> Assim, o facto da idade média da menopausa ser inferior nas mulheres com pré-mutação sugere um aumento da ativação dos folículos primordiais durante o período de pré-menopausa.<sup>39</sup>

Em condições normais, a atresia folicular inicia-se após a seleção do folículo dominante, o qual expande a massa de células da granulosa mais rapidamente do que os restantes folículos. O FSH constitui o principal fator contribuinte para a aceleração da mitose, evitando a apoptose. O estradiol também é essencial para este processo, mas é sintetizado secundariamente à produção de aromatase dependente de FSH. À medida que a velocidade da mitose diminui, as células da granulosa tornam-se menos eficazes a converter o substrato de androgénios em estrogénio, sendo as células direcionadas para a apoptose e os folículos eventualmente para a atresia. As mulheres portadoras de pré-mutação apresentam maior incidência de atresia folicular, que se traduz numa menor percentagem de folículos antrais que se originam a partir dos folículos primordiais. Acredita-se que as células da granulosa nas portadoras de pré-mutação tenham menor capacidade de se multiplicar num ritmo acelerado, o que leva a um menor número de células a expressar recetores FSH e consequentemente a uma menor produção de estradiol. Dado que a produção de androgénios pelas células teca não é contrabalançada, a apoptose é predominante.<sup>39</sup>

A hipótese de que o mecanismo fisiopatológico subjacente à FXPOI seja uma incapacidade de acelerar a taxa de mitose das células da granulosa é consistente com os mecanismos já aceites para a FXTAS. No cérebro de pacientes com FXTAS foram observadas inclusões intranucleares ubiquitina-positivas compostas por mRNA FMR1<sup>39,40</sup> e pela proteína *Fragile X polyglycine* (FMRpolyG).<sup>39</sup> A acumulação de mRNA ocorre quando é excedida a capacidade de eliminação pela via ubiquitina-proteassoma, levando à formação de inclusões intranucleares. Há ainda recrutamento de proteínas de ligação ao RNA (hnRNP A2, Pur  $\alpha$ , SAM-68, entre outras) que são essenciais para o normal funcionamento celular. Ao serem sequestradas nas inclusões, perdem a sua função, havendo uma produção adicional compensatória de RNA e proteínas. Demonstrou-se ainda que a expansão das repetições CGG desencadeia uma translação anormal, não iniciada pelo codão AUG, originando a proteína FMRpolyG (Figura 2). Esta proteína liga-se a moléculas essenciais

para a estabilização da membrana nuclear e para a correta segregação cromossômica, comprometendo a sua função e contribuindo para a toxicidade associada à expansão CGG.<sup>39,41</sup>

As mulheres portadoras de pré-mutação apresentam níveis aumentados de mRNA FMR1 e FMR6 nas células da granulosa, sugerindo que outros RNA possam estar envolvidos na patogênese da FXPOI.<sup>39,42</sup> Demonstrou-se ainda a presença de FMRpolyG no estroma ovárico<sup>43</sup> e nas células da granulosa.<sup>41</sup> Transpondo os mecanismos da FXTAS para a FXPOI, acredita-se que o sequestro de proteínas nas inclusões intranucleares, leve a um trabalho celular adicional que prioriza a reposição das proteínas em falta, refletindo-se numa divisão mais lenta das células granulosa.<sup>39</sup> Desta forma, considera-se que os efeitos tóxicos do mRNA e da FMRpolyG possam causar aumento da atresia folicular ao longo da vida das mulheres portadoras de pré-mutação.<sup>39</sup>

O aumento da atresia dos folículos antrais resulta na diminuição da produção de hormona anti-mülleriana. A HAM constitui um potente supressor da ativação dos folículos primordiais. Está ausente nos folículos primordiais sendo apenas detetável nas células da granulosa dos folículos primários após o início da maturação folicular. A expressão de HAM é máxima nas células da granulosa dos folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais.<sup>20,39</sup> Nos estádios de folículos antrais maiores, torna-se indetetável refletindo o período em que o crescimento folicular é FSH dependente. Assim, a HAM tem um papel importante no início da maturação folicular, regulando o número de folículos que permanece no estadio primordial.<sup>39</sup> As portadoras de pré-mutação apresentam níveis inferiores de HAM,<sup>44,45</sup> o que contribui para uma aceleração da ativação folicular comparativamente com as mulheres com níveis normais da mesma hormona.

Assim, acredita-se que os fenómenos de ativação e atresia folicular possam levar a uma rápida depleção do número de folículos, pelo que previamente à instalação de IOP pode haver algum grau de diminuição de reserva ovárica (DOR). Um estudo propõe a introdução de um novo termo “Diminuição da reserva ovárica associada à Síndrome X frágil” (FXDOR) para as mulheres portadoras de pré-mutação. Este diagnóstico deve ser ponderado após exclusão de todas as causas conhecidas de infertilidade (fator paterno, endometriose, entre outros) em mulheres com menos de 40 anos e com menstruações regulares, independentemente dos níveis de marcadores ováricos. A baixa reserva ovárica pode dificultar procedimentos como a estimulação ovárica controlada, durante a fertilização *in vitro* (FIV).<sup>3,46</sup>

## **Implicações reprodutivas**

A maioria dos casos de Síndrome X frágil resulta da expansão alélica das repetições CGG localizadas na região 5' não traduzida do gene FMR1. Este fenómeno deriva da instabilidade dos alelos com pré-mutação que são transmitidos por via materna à geração seguinte. Assim, as mulheres portadoras de pré-mutação apresentam várias opções reprodutivas, de forma a contornar a possibilidade de terem um filho afetado pela SXF.

A conceção espontânea, isto é, sem usufruto de técnicas de reprodução medicamente assistida é possível nas mulheres portadoras de pré-mutação com IOP, dado que, como referido anteriormente, a função ovárica é intermitente e imprevisível, contrariamente à menopausa.<sup>47</sup> O diagnóstico pré-natal de mutação completa, após conceção espontânea, tem um impacto emocional significativo para os pais, ao tomarem conhecimento de uma doença no feto que pode motivar a interrupção da gravidez. A interrupção da gravidez pode dar origem a questões éticas e médicas, que são evitadas quando se recorre à fertilização in vitro com teste genético pré-implantação, já que este procedimento permite a transferência de embriões sem mutação.<sup>48</sup> Contudo, a fertilização in vitro é um procedimento caro e pode ser especialmente difícil em portadoras de pré-mutação, dada a menor reserva ovárica e, possivelmente, pela menor resposta à estimulação ovárica.<sup>9,46,49</sup> A repercussão da pré-mutação na resposta à estimulação ovárica, durante os procedimentos de FIV, é controversa. Alguns autores consideram que a FIV é uma opção irrealista para estas mulheres pela baixa reserva ovárica e fraca resposta à estimulação ovárica.<sup>50</sup> Outros estudos demonstraram que a FIV é possível em certos casais, apesar da necessidade de utilização de doses mais elevadas de FSH durante a estimulação ovárica nas mulheres portadoras de pré-mutação.<sup>51-54</sup> Alguns casais podem recorrer à adoção ou a oócitos dadores, de forma a contornar o risco genético.<sup>55</sup> Contudo, dada a alta prevalência da pré-mutação na população é recomendada a testagem dos oócitos.<sup>56</sup>

Um estudo conduzido em Israel avaliou, em mulheres grávidas portadoras de pré-mutação, quais os fatores preponderantes na decisão entre FIV com teste genético pré-implantação e conceção espontânea com amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas. A experiência prévia de falência de tratamentos de FIV revelou-se como o fator principal que influencia a escolha de conceção espontânea e diagnóstico pré-natal. Já as mulheres mais velhas e as que experienciaram interrupções de gravidez por filhos afetados preferem procedimentos de FIV.<sup>57</sup>

A pré-mutação parece ter outras implicações reprodutivas, no que diz respeito à frequência de gestações gemelares e abortamentos espontâneos. Estudos revelam maior prevalência de gestações gemelares na descendência de mulheres portadoras de pré-mutação, sobretudo nas que apresentam IOP estabelecida. É reconhecido que a probabilidade de gestação gemelar aumenta com o avançar da idade materna, provavelmente pelo efeito dos níveis superiores de FSH nestas faixas etárias. Na IOP, o excesso de FSH numa idade mais precoce, pode justificar a maior taxa de gestações gemelares.<sup>58</sup> Relativamente aos abortamentos espontâneos, um estudo revelou maior prevalência de alelos CGG na faixa intermédia ou pré-mutação, e menor número de interrupções adenina-guanina-guanina (AGG), em mulheres com história de abortos recorrentes, comparativamente a mulheres saudáveis.<sup>59</sup>

Atualmente, dado que não há forma de prevenção ou reversão da FXPOI, o foco deve assentar na identificação precoce de mulheres com pré-mutação, de forma a oferecer a possibilidade de preservação de fertilidade. O adiamento da maternidade para idades mais avançadas que se tem verificado no mundo ocidental realça a importância de identificar as mulheres portadoras de pré-mutação em tempo útil, pelo risco de infertilidade no futuro. Desta forma, poderão alterar o planeamento familiar, com antecipação da conceção<sup>60</sup>, ou então optar pela criopreservação de ovócitos ou embriões. Desconhece-se se as mulheres portadoras de pré-mutação beneficiariam de criopreservação de tecido ovárico. Esta técnica é útil em mulheres jovens com função ovárica normal que sofrem um dano agudo e isolado nos ovários, após, por exemplo, um tratamento gonadotóxico por malignidade.<sup>9</sup>

## **Estratégia terapêutica**

Tendo em conta que, atualmente, não existe um tratamento específico para a FXPOI, a abordagem desta patologia é semelhante à da IOP. Assim, apesar da heterogeneidade etiológica da IOP, os princípios fundamentais do tratamento são otimizar a saúde da mulher de forma integrada e repor as hormonas reprodutivas da forma mais fisiológica possível.<sup>9</sup>

### Suporte emocional

O diagnóstico de IOP pode ter repercussões emocionais marcadas para a mulher, que se depara, de uma forma inesperada, com o problema da infertilidade, ainda que a conceção possa ocorrer nos períodos intermitentes de recuperação da função ovária.<sup>21</sup> Adicionalmente, as mulheres portadoras de pré-mutação apresentam maior prevalência de ansiedade e depressão, que podem ser desencadeadas pelo diagnóstico de IOP.<sup>3,61</sup> Os profissionais de saúde assumem um papel determinante na medida em que devem fornecer informações acerca do diagnóstico e ferramentas disponíveis para assegurar a maternidade.

### Terapia de reposição hormonal

A terapia de reposição hormonal (TRH) é recomendada em mulheres com IOP, dado que além de aliviar os sintomas de hipoestrogenismo, como os sintomas vasomotores e a disfunção sexual associada à secura vaginal e dispareunia, tem um efeito benéfico na massa óssea.<sup>10</sup>

Com o objetivo de avaliar a frequência de reposição hormonal adequada, foram entrevistadas 79 mulheres com diagnóstico de pré-mutação. Muitas mulheres reportaram que os profissionais de saúde nunca mencionaram ou até desaconselharam esta terapêutica. Contudo, os riscos e benefícios da TRH para as mulheres que atingem a menopausa na idade fisiológica não podem ser extrapolados para mulheres jovens com IOP, visto que são clinicamente distintas. Assim, existe uma janela temporal na qual os riscos associados à terapia de reposição hormonal estão atenuados.<sup>11</sup>

Nas mulheres em idade reprodutiva, o estradiol é o estrogénio predominante, atingindo, em condições normais, valores séricos médios de 100 pg/mL. Tanto o adesivo transdérmico como o anel vaginal fornecem quantidade diária fisiológica de estradiol. Além disso, geralmente normalizam os níveis de LH, o que pode aumentar a probabilidade de ovulação. As vias

transdérmica (adesivo ou gel) e transvaginal de administração de estradiol são preferidas à via oral, por apresentarem menor risco de tromboembolismo venoso. Recomenda-se a associação de acetato de medroxiprogesterona oral, 12 dias por mês, para proteção contra hemorragia menstrual severa e cancro do endométrio.<sup>61</sup>

Os contraceptivos orais contêm doses suprafisiológicas de estrogénios, não sendo utilizados para reposição hormonal nas mulheres com IOP dada a menor eficácia na manutenção da densidade óssea relativamente à reposição com doses fisiológicas. Tal facto foi comprovado por um estudo que demonstrou maior densidade óssea na coluna lombar nas mulheres com IOP sob TRH comparativamente às que utilizavam contraceptivos orais.<sup>9</sup>

### Modificação do estilo de vida

De forma a minimizar a perda de massa óssea, as mulheres com IOP devem assumir uma dieta saudável e equilibrada e praticar exercício físico com carga. Deve ser assegurada a ingestão de cálcio nas quantidades diárias recomendadas de acordo com a faixa etária (1000 mg para mulheres entre os 19-50 anos e 1300 mg para raparigas entre os 9-18 anos). É recomendado um valor sérico de vitamina D (25-hidroxivitamina D) de 30 ng/mL, estando indicada a suplementação em mulheres com baixa exposição solar. Os suplementos de cálcio aumentam a densidade mineral óssea, mas não reduzem o risco de fraturas e aumentam o risco de enfarte agudo do miocárdio. Os bifosfonatos não são recomendados dado o seu efeito tóxico para os embriões caso ocorra uma gravidez subsequente.<sup>61</sup>

### Contraceção

Na IOP a função ovárica é intermitente e imprevisível, pelo que as mulheres que não pretendem engravidar devem recorrer a métodos contraceptivos.<sup>3</sup> Os dispositivos intrauterinos e os métodos de barreira são os preferidos, em detrimento dos contraceptivos orais, que podem ter eficácia reduzida no contexto de IOP, possivelmente pela incapacidade de suprimir o FSH que se encontra anormalmente elevado.<sup>61</sup> Em mulheres sexualmente ativas, na presença de atraso menstrual deve ser realizado um teste de gravidez.



## VII. PRÉ-MUTAÇÃO E SÍNDROME DO TREMOR-ATAXIA ASSOCIADA AO X FRÁGIL

O gene FMR1 apresenta uma função determinante no sistema nervoso, conforme evidenciado pela sua expressão abundante de FMRP no tecido neural de humanos e pelo fenótipo clínico dos pacientes com Síndrome do X frágil, que se associa a ausência de FMRP. Simultaneamente, desvios da expressão normal do produto proteico, como no caso da pré-mutação, também resultam em efeitos deletérios no funcionamento do sistema nervoso, explicando a Síndrome do tremor-ataxia associada ao X frágil.<sup>2</sup>

A Síndrome do tremor-ataxia associada ao X frágil é uma doença neurodegenerativa de início tardio, com maior prevalência em homens a partir dos 50 anos, que se caracteriza principalmente por tremor de intenção seguido de ataxia cerebelar, em 90% e 20% dos pacientes, respetivamente.<sup>62</sup> Contudo, tanto o tremor como a ataxia podem ser o sintoma inicial de apresentação. Geralmente o tremor de intenção é progressivo, afetando inicialmente a escrita e posteriormente outras atividades de vida diária como alimentação.<sup>63</sup> Acompanha-se frequentemente de outros sintomas neurológicos como neuropatia periférica, parkinsonismo, perda de memória a curto prazo, declínio cognitivo, atrofia cerebral, fraqueza muscular proximal e disfunção autonómica.<sup>7,40</sup> Dada a variabilidade de sintomas, os doentes com FXTAS são frequentemente diagnosticados, numa fase inicial, com outras doenças neurológicas comuns como doença de Parkinson e tremor essencial.<sup>64</sup> O agravamento da prevalência e sintomas da FXTAS com a idade apoia a hipótese de que há acumulação do efeito tóxico do mRNA ao longo dos anos.<sup>62</sup> Entre portadores de pré-mutação, estima-se que 40% dos homens irão desenvolver sintomas de FXTAS, contrastando com 16,5% entre as mulheres. A percentagem de mulheres afetadas pode estar subestimada, dado que apresentam um fenótipo mais ligeiro da doença, sendo necessário um alto nível de suspeição para o seu diagnóstico.<sup>65</sup> Esta diferença epidemiológica e fenotípica entre sexos é provavelmente explicada pelo efeito protetor da expressão de FMR1 pelo alelo normal do cromossoma X no sexo feminino.<sup>2,66,67</sup> Atualmente, existem relatos clínicos de FXTAS e insuficiência ovária primária diagnosticados na mesma paciente.<sup>65,68</sup>

Os achados imagiológicos da FXTAS, na ressonância magnética nuclear (RMN), incluem atrofia cerebral global, hiperintensidade da substância branca<sup>69</sup>, em particular dos pedúnculos cerebelares médios (MCP) e dilatação dos ventrículos.<sup>63,70</sup> Estas alterações correlacionam-se com o número de repetições CGG e tornam-se mais severas com o envelhecimento.<sup>69</sup> Na RMN, o hipersinal em T2 nos MCP é um achado relativamente distinto, presente em aproximadamente 60%

dos homens portadores de pré mutação com envolvimento neurológico, pelo que é atualmente considerado um dos critérios de diagnóstico da FXTAS.<sup>63,70</sup>

## VIII. EXPANSÃO ALÉLICA E SÍNDROME DO X FRÁGIL

Os alelos pré-mutados são instáveis e, por isso, suscetíveis de expansão quando transmitidos à geração seguinte, apresentando um risco de evolução para mutação completa. A Síndrome X frágil segue um padrão de hereditariedade ligado ao cromossoma X extremamente complexo. A transmissão à descendência é influenciada pelo sexo do parente que transmite o gene, o sexo da criança, o número de repetições CGG e pela estabilidade do alelo afetado mediada pelas interrupções AGG.<sup>3,71,72</sup>

Importa referir que apenas a transmissão por via materna pode levar à expansão do número de repetições para a faixa de mutação completa. Assim, as mulheres portadoras de pré-mutação podem gerar, na descendência, formas alélicas de pré-mutação com um número maior de repetições CGG ou formas alélicas de mutação completa.<sup>1,3,72</sup> Dada a hereditariedade ligada ao X, os homens portadores de pré-mutação ou mutação completa apenas transmitem pré-mutação às filhas.<sup>1,3</sup> Tendo em conta que 40% das filhas de homens portadores de pré-mutação apresentam repetições em menor número do que o pai, acredita-se que durante a transmissão paterna pode haver regressão do número de repetições.<sup>3</sup> Por outro lado, um estudo sugere que as mulheres que herdaram a pré-mutação do pai, têm um risco acrescido de IOP<sup>73</sup>, embora estudos subsequentes não suportem essa associação.<sup>74-76</sup>

O aumento do número de repetições CGG encontra-se diretamente relacionado com o risco de expansão para mutação completa na descendência.<sup>77</sup> A presença de um número de repetições superior a 100 apresenta um risco de 98% de expansão para mutação completa, contrastando com 3,7% quando há 55-59 repetições CGG. As mulheres com alelos na faixa intermédia, isto é, entre 45 e 54 repetições CGG, apesar de poderem expandir para pré-mutação, não evoluem para mutação completa na geração seguinte.<sup>3</sup>

A presença de interrupções AGG confere estabilidade ao alelo, diminuindo o risco de expansão para mutação completa, sobretudo na presença de um número inferior a 100 repetições. Numa mulher portadora de pré-mutação com 55-59 repetições, a presença de pelo menos uma interrupção AGG reduz o risco de expansão para mutação completa de 3,7% para menos de 1%.<sup>3</sup>

A forma alélica de mutação completa, que se associa à Síndrome X frágil, define-se por um número de repetições CGG superior a 200 e resulta no silenciamento do gene FMR1 através da sua metilação, tanto no sexo masculino como no feminino. Consequentemente, a ausência da proteína

FMRP, um regulador da translação, afeta a síntese de proteínas essenciais para a plasticidade sináptica cerebral.<sup>78</sup> Estas alterações relativas à mutação completa estão na origem da deficiência intelectual, que se apresenta de forma variável. A Síndrome do X frágil associa-se a distúrbios do espectro do autismo, dificuldade de aprendizagem e a um perfil psiquiátrico de ansiedade, evicção social e hiperatividade. São frequentes outras condições médicas como convulsões, otite média recorrente, estrabismo e obesidade. Os indivíduos com esta doença podem apresentar características faciais distintivas, como face alongada, palato alto e orelhas proeminentes e macroorquidismo (durante e após a puberdade). Distúrbios do tecido conjuntivo mediados por desregulação da elastina podem estar presentes, sob a forma de hiperextensibilidade das articulações, sobretudo nos dedos, pés planos com pronação, prolapso da válvula mitral, raiz da aorta dilatada e escoliose (Figura 3).<sup>55,62,79,80</sup>

De forma semelhante à Síndrome do tremor-ataxia associada ao X frágil, as mulheres apresentam um fenótipo mais ligeiro de alterações faciais, cognitivas e comportamentais, dada a presença de um cromossoma X não afetado capaz de produzir FMRP. Estudos apontam para uma prevalência de 53 a 71% de QI borderline e de deficiência intelectual em mulheres com mutação completa.<sup>55</sup>

O sistema *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) trata-se uma ferramenta de edição genómica que permite alterar regiões específicas. Aplicou-se esta ferramenta ao Síndrome do X frágil, procedendo-se à excisão das repetições CGG expandidas de um alelo com mutação completa com o objetivo de torná-lo num alelo sem repetições CGG. Através da edição genómica, reativou-se o gene FMR1 que se traduziu na restauração da produção de FMRP. Recentemente, foram desenvolvidas ferramentas de edição do estado de metilação do DNA que visam reverter a hipermetilação do gene FMR1. A desmetilação da expansão CGG através de dCas9-Tet1/sgRNA alterou o estado de heterocromatina do promotor de FMR1 para um estado de cromatina ativa, restaurando a expressão de FMR1. Ambas as técnicas de edição genómica sugerem potenciais futuras terapêuticas para os embriões com Síndrome X frágil das mulheres com pré-mutação FMR1 que são submetidas a FIV.<sup>81</sup>

## IX. RASTREIO E DIAGNÓSTICO DE PRÉ-MUTAÇÃO

O *American College of Obstetrics and Gynecology* (ACOG) recomenda o rastreio de portadoras de pré-mutação nas mulheres grávidas, ou que pretendem engravidar, com história familiar de doenças relacionadas com o X frágil ou défice intelectual. Também enfatizam a importância de testar mulheres que apresentam insuficiência ovárica inexplicada e/ou níveis de FSH na faixa da menopausa antes dos 40 anos.<sup>80</sup> Contudo, o cumprimento destas *guidelines* apenas identifica 50% dos portadores de X frágil, havendo estudos que propõe a expansão de critérios com a inclusão de antecedentes familiares de distúrbios do espectro do autismo e distúrbios comportamentais<sup>82</sup> ou um rastreio universal<sup>83,84</sup>. O rastreio universal de pré-mutação a todas as mulheres grávidas é controverso.<sup>85</sup> Estima-se que a frequência de pré-mutação em mulheres sem história familiar de défice intelectual, problemas de desenvolvimento ou autismo seja 1 em 157.<sup>86</sup>

Os métodos para detetar as repetições CGG na região 5' não traduzida do gene FMR1 são sensíveis e específicos não só para os pacientes sintomáticos como também para os portadores assintomáticos da mutação. O diagnóstico molecular consiste na análise do DNA extraído de uma amostra sanguínea, com o objetivo de determinar o número de repetições e o estado de metilação dos alelos expandidos. Contudo, os laboratórios geralmente necessitam de usar mais do que um método de diagnóstico, já que não existe um ideal para caracterizar todos os aspetos da mutação FMR1.<sup>87</sup> As técnicas baseadas na *Polymerase Chain Reaction* (PCR) são geralmente acessíveis, rápidas e simples e incluem análise por eletroforese (em gel de acrilamida ou eletroforese capilar).<sup>87,88</sup> No entanto, a amplificação de regiões ricas em CG é difícil, pelo que apenas os alelos com menos de 100 repetições CGG são passíveis de amplificação por PCR (Tabela II), embora esporadicamente haja expansão de alelos maiores.<sup>87</sup> Como as mutações completas não são amplificáveis através da PCR convencional<sup>62,89,90</sup>, a ausência de amplificação em homens, pode indicar a presença de um alelo expandido, patológico. Nas mulheres, a presença na eletroforese de uma única banda, na faixa normal, não permite a distinção entre as homozigóticas e as portadoras de um alelo expandido que não foi amplificado.<sup>62,87</sup> Outra desvantagem da PCR convencional é o facto de não informar acerca do estado de metilação.<sup>91</sup> Assim, posteriormente é geralmente necessária a análise por *Southern Blot*, não só para determinar as dimensões dos alelos maiores refratários à amplificação por PCR, como também para distinguir as mulheres normais homozigóticas das portadoras da pré-mutação.<sup>91</sup> A necessidade de utilização desta técnica torna o rastreio do SXF relativamente dispendioso e demorado.<sup>88,89</sup> O *Southern Blot* consiste na avaliação

do locus FRAXA, do gene FMR1 e do estado de metilação (Tabela II). Estes dados permitem determinar o nível de expressão da proteína FMRP.<sup>9</sup>

Avanços na tecnologia do PCR levaram à introdução do TP-PCR (*triplet primed PCR*), que conjuga a técnica de PCR clássica com um *primer* que hibridiza os trinucleotídeos CGG. Permite detetar, com exatidão, pré-mutações e mutações completas, por vezes eliminando a necessidade de confirmação por *Southern Blot* (Tabela II).<sup>9,62</sup> Adicionalmente, deteta sequências constituídas por nucleótidos AGG que interrompem periodicamente a repetição CGG no gene FMR1. A caracterização do padrão de interrupção por AGG permite inferir acerca do risco de instabilidade da repetição durante a transmissão dos progenitores para os filhos<sup>9</sup> e do risco de diminuição da reserva ovária.<sup>92</sup>

Um estudo propõe a introdução de um protocolo distinto para os homens e as mulheres. Em ambos, o passo inicial consiste na amplificação através da PCR. No sexo masculino, a ausência de amplificação exige a avaliação do estado de metilação, pelo que, em detrimento do *Southern Blot*, sugerem a aplicação da técnica *Methylation-Specific Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification assay* (MS-MLPA), por ser mais rápida e menos dispendiosa. Dado que esta técnica não é fidedigna em mulheres, pela inativação aleatória do cromossoma X, a presença de apenas um fragmento amplificado exige a confirmação por *Southern Blot*.<sup>93</sup>

## **X. ACONSELHAMENTO GENÉTICO**

Além das implicações reprodutivas da FXPOI, as mulheres portadoras de pré-mutação devem estar conscientes do risco de expansão alélica na descendência e consequente desenvolvimento da Síndrome do X frágil. Adicionalmente, devem ter o conhecimento de outras patologias associadas à pré-mutação, particularmente a Síndrome do tremor-ataxia associada ao X frágil (FXTAS), que podem afetar as gerações seguintes.<sup>9,94,95</sup> Contudo, a detecção de embriões com pré-mutação, levanta questões éticas relacionadas com o rastreio de doenças que apenas se manifestam na idade adulta ou, na maioria dos casos, que nunca se chegam a desenvolver.<sup>94,96</sup>

O aconselhamento genético é essencial para todos os portadores de pré-mutação e mutação completa, bem como indivíduos com resultados na faixa intermédia (45-54 repetições).<sup>80</sup> No caso de pré-mutação, o aconselhamento deve abranger o cálculo do risco de expansão do alelo para mutação completa na geração seguinte. Para tal, é necessário o conhecimento do número de repetições CGG e o número de interrupções AGG no alelo materno.<sup>3</sup>

A consulta de aconselhamento genético pode ser mais difícil e demorada comparativamente ao aconselhamento para o Síndrome de *Down*, pela possibilidade de diferentes fenótipos com base no número de repetições e sexo fetal e pela menor sensibilização da população em relação ao SXF.<sup>97</sup> Um estudo que incluía mulheres referenciadas para aconselhamento genético, por idade materna avançada, revelou que dois terços não tinham conhecimento da existência do SXF.<sup>98</sup>

### **Teste genético pré implantação**

O objetivo do teste genético pré-implantação é a seleção e transferência de embriões com número normal de repetições CGG. Após estimulação ovárica controlada, procede-se à recuperação e fertilização de ovócitos, geralmente por injeção intracitoplasmática de espermatozoides. A biópsia embrionária é realizada em 1-2 blastómeros no caso de um embrião de 3 dias<sup>15,99</sup> ou em 5-8 células no caso de um embrião na fase de blastocisto. Posteriormente, procede-se à análise genética.<sup>3</sup> Contrariamente às restantes doenças com hereditariedade ligada ao X, a seleção exclusiva de embriões do sexo feminino não é viável, dado que as mulheres podem manifestar doenças associadas ao X frágil.<sup>90</sup> Enquanto que para o diagnóstico pré-natal é imprescindível o conhecimento do número preciso de repetições CGG, no teste genético pré-

implantação basta a identificação dos embriões que não possuem o alelo pré-mutado ou mutado.<sup>100</sup>

O facto de o *Southern Blot*, *gold standard* no diagnóstico molecular da Síndrome X frágil<sup>80</sup>, requerer grandes quantidades de DNA<sup>100</sup>, impossibilita a sua utilização no contexto do teste genético pré-implantação, dado que a amostra consiste em células únicas extraídas do embrião.<sup>101</sup>

O primeiro teste genético pré-implantação para a SXF foi realizado em 1995<sup>102</sup> e baseava-se apenas na deteção por PCR dos alelos maternos e paternos não expandidos. Por este motivo, eram oferecido exclusivamente a casais informativos, isto é, cujos alelos FMR1 materno e paterno normais diferissem no número de repetições CGG. Posteriormente, eram selecionados os embriões que apresentassem o alelo materno normal. No entanto, apenas 63% dos casais que requisitam o teste genético pré-implantação para SXF são informativos.<sup>103</sup> Por outro lado, pode haver falha de amplificação por PCR (*allele dropout* - ADO), sobretudo na presença de um grande número de repetições CGG, impossibilitando a distinção entre embriões do sexo feminino homozigóticos (normais) e heterozigóticos (com um alelo normal e outro com pré-mutação que não foi amplificado).<sup>102</sup>

Para os casais não informativos, isto é, com número de repetições idênticas nos alelos normais, o teste genético pré-implantação assenta na análise de ligação de marcadores polimórficos. Esta técnica baseia-se no facto de que sequências de DNA que estão próximas num cromossoma são herdadas juntas, pelo que vários marcadores são segregados juntamente com a mutação. Os marcadores polimórficos mais utilizados são os *Short Tandem Repeats* (STR), fragmentos repetitivos de DNA com 2-6 pares de bases, cuja estrutura é herdada através de gerações. Assim, de forma a determinar os marcadores mais adequados para cada caso, procede-se ao teste genético do casal e de pelo menos um membro da família afetado.<sup>3,101</sup> Desta forma, a análise de ligação é um método indireto para a identificação dos alelos com mutação no embrião.<sup>3</sup> Contudo, neste procedimento há risco de eventos de recombinação, o que pode levar a erros de diagnóstico.<sup>50</sup>

De forma a contornar as dificuldades inerentes a cada técnica supracitada, uma equipa em 2007 desenvolveu um protocolo que incluía a coamplificação de vários loci por *multiplex nested PCR* e de marcadores polimórficos que são segregados conjuntamente com a mutação.<sup>100</sup>



## Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado com recurso a biópsia de vilosidades coriônicas ou amniocentese, durante o primeiro ou segundo trimestre de gestação. É preferencialmente realizado quando o risco de expansão alélica calculado para mutação completa é baixo (inferior a 5%) ou quando o casal não realiza o teste genético pré implantação. No entanto, a realização de testes invasivos nas mulheres com repetições CGG na faixa intermédia deve ser desaconselhada por não haver risco de expansão para mutação completa na geração seguinte.<sup>104</sup> Apesar de ambas as técnicas apresentarem baixo risco de perda gestacional, no caso de alelos na faixa intermédia, a probabilidade de dano fetal é provavelmente superior ao risco de expansão para mutação completa.<sup>3,105</sup>

A biópsia das vilosidades coriônicas é uma técnica invasiva guiada por ecografia, que consiste na obtenção de células da placenta, por via transabdominal ou transvaginal, consoante a posição da placenta ou experiência do operador, para análise genética. A realização entre as 10-13 semanas é uma das suas principais vantagens comparativamente à amniocentese, já que permite um diagnóstico e intervenção mais precoces. Teoricamente, a placenta e o feto são geneticamente idênticos, dado que apresentam a mesma origem embrionária. Contudo, em casos raros, pode ocorrer mosaicismo placentário, no qual a placenta e o feto apresentam linhas celulares diferentes, pondo em causa a eficácia da biópsia das vilosidades coriônicas.

A amniocentese elimina o risco de mosaicismo placentário já que utiliza líquido amniótico que contém células fetais. É realizada numa fase mais avançada da gravidez, após as 15 semanas de gestação.<sup>3</sup>

Independentemente da técnica escolhida para obtenção das células, o passo seguinte inclui a análise genética que engloba a PCR e o *Southern Blot*.<sup>106</sup> O primeiro procedimento visa determinar o número de repetições CGG dentro do alelo de forma a classificá-lo em normal, intermédio, pré-mutação ou mutação completa. O *Southern blot*, posteriormente, diferencia, com maior exatidão, a pré-mutação da mutação completa e determina a atividade transcripcional através do estado de metilação. A PCR *AmplideX* permite, em alternativa, determinar o número de repetições CGG, interrupções AGG e a metilação do DNA.<sup>3</sup>

A presença de FMRP nos citotrofoblastos de fetos do sexo masculino controlo e a ausência de FMRP nos fetos com mutação completa são a base dos estudos imunohistoquímicos das biópsias

de vilosidades coriônicas. A idade gestacional é um fator importante devido ao *timing* de inativação do FMR1. O facto de haver expressão de FMRP às 10 semanas de gestação tanto no grupo controlo como no grupo com mutação completa sugere ausência de inativação do FMR1 até essa idade gestacional. Às 12 semanas de gestação, a inativação do FMR1 está completa pelo que não há deteção de FMRP a partir dessa idade gestacional. Em fetos do sexo feminino com mutação completa, a partir das 13 semanas de gestação, a expressão de FMRP está completamente ausente em algumas vilosidades e presente noutras. A presença de FMRP é explicada pela presença de um cromossoma X normal ativo. A ausência de expressão de FMRP nestes casos apenas pode ocorrer quando há ausência de expressão do gene FMR1, devido a mutação completa, juntamente com inativação do cromossoma X normal. A inativação do cromossoma X é um processo aleatório, comprovado pela existência de vilosidades com e sem FMRP. Além disso, a inativação do cromossoma X ocorre precocemente no desenvolvimento, antes da proliferação das vilosidades, já que cada vilosidade é completamente positiva ou completamente negativa para FMRP.<sup>107</sup>

Aquando da interpretação das amostras das biópsias das vilosidades coriônicas, enquanto o número de repetições CGG é determinado com exatidão, o padrão de metilação pode não ser fidedigno, já que o processo de metilação está incompleto até às 10-12 semanas de gestação. Portanto, em ambos os casos, pode ser necessária uma amniocentese de confirmação, que determina de forma fidedigna o número de repetições e o estado de metilação.<sup>55</sup>

## XI. CONCLUSÃO

A importância da análise molecular do gene FMR1 durante a investigação de IOP baseia-se na associação significativa entre esta entidade e a forma alélica de pré-mutação. De facto, a pré-mutação é responsável por 2-11% dos casos de IOP<sup>11</sup> e a IOP ocorre em 20% das mulheres portadoras de pré-mutação<sup>16,60</sup>. Durante a investigação do impacto da pré-mutação no ovário, foi demonstrada a acumulação de mRNA FMR1 e FMRpolyG no estroma ovárico e nas células da granulosa, o que levou à extrapolação dos mecanismos fisiopatológicos da FXTAS para a FXPOI. Atualmente considera-se que a toxicidade mediada pelo excesso de mRNA e de FMRpolyG possa causar aumento da atresia folicular nas mulheres portadoras de pré-mutação.

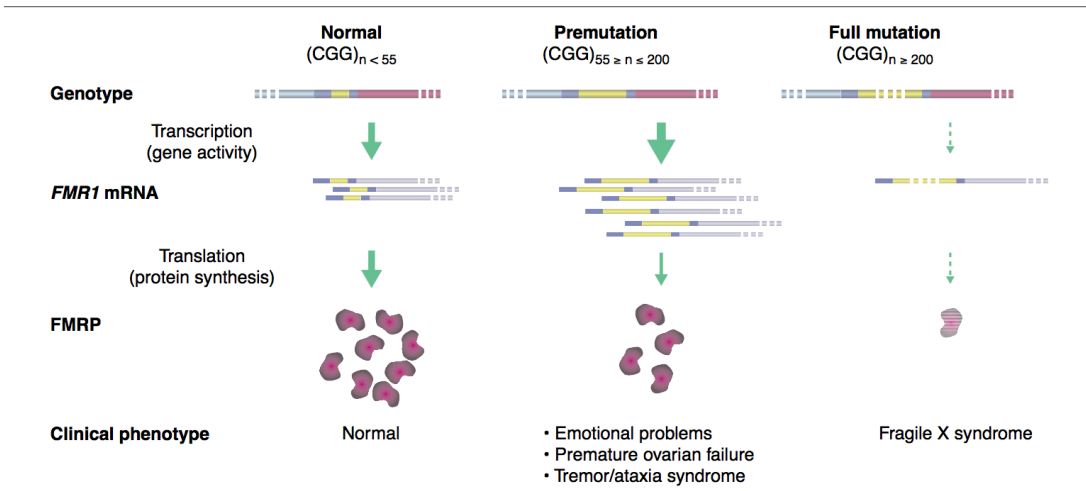
O diagnóstico de pré-mutação em mulheres que pretendem engravidar, previamente ao estabelecimento de insuficiência ovárica, exige um alto nível de suspeição clínica e uma anamnese completa por parte do profissional de saúde. A colheita de uma história familiar extensa, multigeracional, com pesquisa de doenças familiares relacionadas com o X frágil ou défice intelectual pode ser difícil. A identificação precoce da pré-mutação visa minimizar o impacto clínico e emocional que esta condição pode ter na saúde da mulher e na sua descendência, dado o risco de expansão alélica para mutação completa e SXF. Por um lado, possibilita que as portadoras de pré-mutação, que ainda não desenvolveram insuficiência ovárica, tenham conhecimento do risco de infertilidade no futuro e, consequentemente, maior poder de escolha relativamente à sua reprodução. Contudo, previamente à instalação de IOP pode haver diminuição da reserva ovárica, dificultando procedimentos como a fertilização in vitro. O grau de resposta à estimulação ovárica é controverso, com estudos a demonstrar resultados contraditórios. O recurso a oócitos dadores e a adoção são opções nas mulheres com pré-mutação e baixa reserva ovárica ou que pretendem contornar o risco de terem filhos afetados por SXF.

O aconselhamento genético do SXF é um desafio pelo tempo e conhecimento necessários para seleccionar adequadamente casais em risco, pelo complexo padrão de hereditariedade desta doença e pela variabilidade fenotípica associada à pré-mutação e mutação completa. É recomendado a todos os portadores de alelos na faixa intermédia, pré-mutação e mutação completa. Contudo, a realização de procedimentos invasivos para diagnóstico pré-natal no primeiro grupo é desaconselhada, por não haver risco de expansão para mutação completa e consequente SXF na geração seguinte. Relativamente à hereditariedade ligada ao X do SXF, apenas a transmissão materna pode levar à expansão do número de repetições para a faixa de mutação completa, havendo, por vezes, regressão das repetições durante a transmissão paterna. Adicionalmente, é

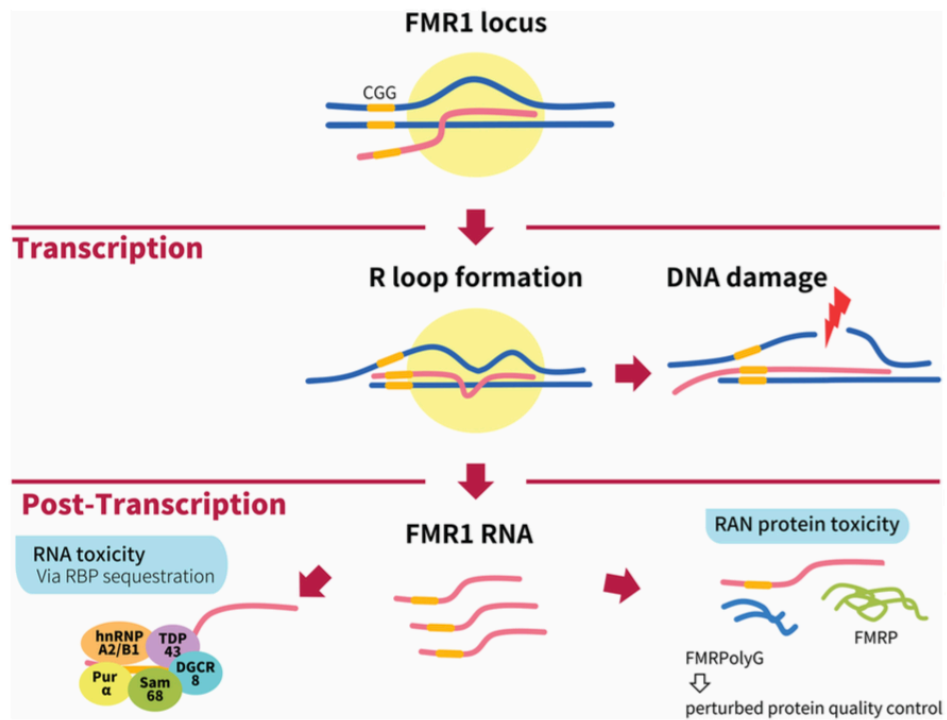
necessário transmitir ao casal a imprevisibilidade do fenótipo nos portadores de pré-mutação e das mulheres com mutação completa. Este facto gera discordâncias relativamente à implementação de um rastreio universal no âmbito do diagnóstico pré-natal, na medida em que a maioria dos indivíduos portadores de pré-mutação tem uma vida normal e não manifestam FXPOI ou FXTAS na idade adulta. Por outro lado, dada a severidade da SXF, a alta frequência de portadores e existência de métodos de diagnóstico fiáveis, alguns investigadores defendem a sua implementação universal. Todos estes pontos devem ser referenciados na consulta de aconselhamento genético.

De forma a tornar o rastreio de pré-mutação e de Síndrome do X frágil mais acessível e menos dispendioso, têm surgido vários protocolos e novos métodos de diagnóstico que detetam com precisão o número de repetições CGG, o padrão de interrupções AGG e o estado de metilação. Este facto em conjunto com o progresso ao nível da compreensão da fisiopatologia das doenças associadas à Síndrome X frágil pode favorecer a investigação de potenciais tratamentos.

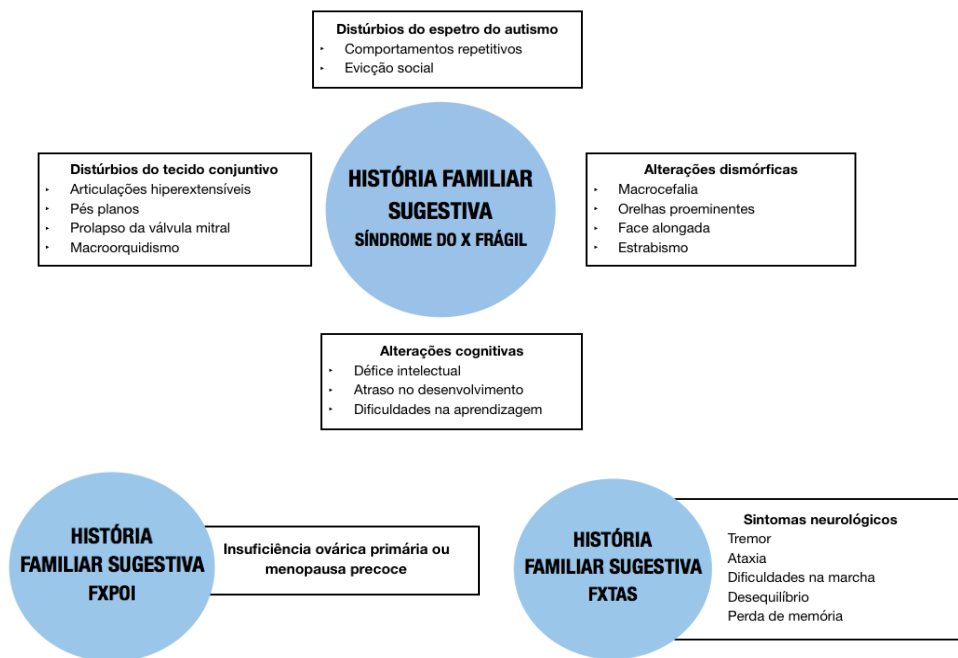
XII. ANEXOS



**Figura 1** – Ilustração dos padrões de expressão do gene FMR1 nos indivíduos com alelos normais, pré-mutação e mutação completa.<sup>7</sup>



**Figura 2** - Ilustração dos mecanismos fisiopatológicos da FXTAS.<sup>39</sup>



**Figura 3** - Esquema dos antecedentes familiares que sugerem doenças associadas ao X frágil. Adaptado de [46]

**Tabela I** - Correspondência entre as formas alélicas do gene FMR1 e o número de repetições do trinucleotídeo CGG.

| FORMA ALÉLICA    | NÚMERO DE REPETIÇÕES |
|------------------|----------------------|
| Normal           | < 45                 |
| Intermédia       | 45 - 54              |
| Pré-mutação      | 55 - 200             |
| Mutação completa | > 200                |



**Tabela II** - Comparação entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico de pré-mutação e mutação completa.

|                     | PCR CONVENCIONAL                                         | TP-PCR                             | SOUTHERN BLOT          |
|---------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Normal              | ✓                                                        | ✓                                  | ✓                      |
| Intermédia          | ✓                                                        | ✓                                  | ✓                      |
| Pré-mutação         | ✓                                                        | ✓                                  | ✓                      |
| Mutação completa    | X                                                        | ✓                                  | ✓                      |
| Estado de metilação | X                                                        | X                                  | ✓                      |
| Desvantagens        | Alelos com maior número de repetições não são expandidos | Não informa do estado de metilação | Dispendioso e demoroso |

### XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Montserrat M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: an overview and update of the FMR1 gene. *Fragile X syndrome* :38.
2. Hoyos LR, Thakur M. Fragile X premutation in women: recognizing the health challenges beyond primary ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet* 2017;34(3):315–323.
3. Man L, Lekovich J, Rosenwaks Z, Gerhardt J. Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency from Molecular Mechanisms to Clinical Manifestations. *Front Mol Neurosci* 2017;10:290.
4. Bione S, Toniolo D. X Chromosome Genes and Premature Ovarian Failure. 2000;18(1):8.
5. Elizur SE, Friedman Gohas M, Dratviman-Storobinsky O, Cohen Y. Pathophysiology Mechanisms in Fragile-X Primary Ovarian Insufficiency [Internet]. In: Ben-Yosef D, Mayshar Y, editors. *Fragile-X Syndrome*. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2020 Oct 23]. p. 165–171. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9080-1\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9080-1_14)
6. Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clinical Genetics* 2011;20.
7. Hagerman RJ, Hagerman PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. :6.
8. Peprah E. Understanding decreased fertility in women carriers of the FMR1 premutation: a possible mechanism for Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). *Reprod Health* 2014;11(1):67.
9. Fink DA, Nelson LM, Pyeritz R, et al. Fragile X Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI): Case Report and Literature Review. *Front Genet* 2018;9:529.
10. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R. Management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2016;161.
11. Hipp HS, Charen KH, Spencer JB, Allen EG, Sherman SL. Reproductive and gynecologic care of women with fragile X primary ovarian insufficiency (FXPOI): *Menopause* 2016;23(9):993–999.
12. Tural S, Tekcan A, Kara N, Elbistan M, Güven D, Tasdemir HA. FMR1 gene mutation screening by TP-PCR in patients with premature ovarian failure and fragile-X. *Gynecol Endocrinol* :5.
13. Caro JJD, Dominguez C, Sherman SL. Reproductive Health of Adolescent Girls Who Carry the FMR1 Premutation. *Annals of the New York Academy of Sciences* :13.
14. Hantash FM, Goos DM, Crossley B, et al. FMR1 premutation carrier frequency in patients undergoing routine population-based carrier screening: Insights into the prevalence of fragile X syndrome, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, and fragile X-associated primary ovarian insufficiency in the United States. *Genetics IN Medicine* 2011;13(1):7.
15. Martin JR, Arici A. Fragile X and reproduction. :5.
16. Sherman SL, Allen EG, Grus WE, Narayan S, Espinel W. Approaches to identify genetic variants that influence the risk for onset of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI): a preliminary study. *Frontiers in Genetics* :8.
17. Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, et al. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. :11.
18. Partington MW, Moore DY, Turner GM. Confirmation of early menopause in fragile X carriers. :3.
19. Murray A. Premature Ovarian Failure and the FMR1 Gene. In: *Semin Reprod Med*. 2000.
20. Baker VL. Primary ovarian insufficiency in the adolescent. *Adolescent and pediatric gynecology* 2013;25(5):7.
21. Gordon CM, Kanaoka T, Nelson LM. Update on primary ovarian insufficiency in adolescents. *Endocrinology and metabolism* 2015;27(4):9.
22. Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, et al. Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1premutation. *Human Reproduction* 2007;22(8):2142–2152.

23. Ennis S, Ward D, Murray A. Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. 2013;5.
24. Tejada M-I, Garcia-Alegria E, Bilbao A, et al. Analysis of the molecular parameters that could predict the risk of manifesting premature ovarian failure in female premutation carriers of fragile X syndrome. 2008;5.
25. Mailick MR, Hong J, Greenberg J, Smith L, Center W, Sherman S. Curvilinear Association of CGG Repeats and Age at Menopause in Women with FMR1 Premutation Expansions. 2015;16.
26. Huang J, Zhang W, Liu Y, Liu Y, Wang J, Jiang H. Association between the FMR1 CGG repeat lengths and the severity of idiopathic primary ovarian insufficiency: a meta analysis. *ARTIFICIAL CELLS* :8.
27. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genetics in medicine* 2014;16(1):6.
28. Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP. FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. :7.
29. Bodega B, Bione S, Dalprà L, et al. Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod* 2006;
30. Kline JK, Kinney AM, Levin B, Brown SA, Hadd AG, Warburton D. Intermediate CGG repeat length at the FMR1 locus is not associated with hormonal indicators of ovarian age. 2015;22.
31. Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Charen KH, Sherman L. Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency: Evidence for Additional Genetic Contributions to Severity. 2010;14.
32. Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. The genetic basis of premature ovarian failure. 2006;3.
33. Lin Y-S, Yang M-L. Familial Premature Ovarian Failure in Female Premutated Carriers of Fragile X Syndrome: a Case Report and Literature Review. 2006;45(1):4.
34. Wheeler A, Raspa M, Hagerman R, Mailick M, Riley C. Implications of the FMR1 Premutation for Children, Adolescents, Adults, and Their Families. 2017;17.
35. Marino R. Bone Health in Primary Ovarian Insufficiency. *Seminars in reproductive medicine* 2011;29(4):11.
36. Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure. 2009;15(2):5.
37. Sherman SL, Curnow EC, Easley CA, et al. Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). 2014;12.
38. Hoffman GE, Le WW, Entezam A, et al. Ovarian Abnormalities in a Mouse Model of Fragile X Primary Ovarian Insufficiency. :18.
39. Rose BI, Brown SE. An explanation of the mechanisms underlying fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet* 2020;37(6):1313–1322.
40. Raske C, Hagerman PJ. Molecular Pathogenesis of FXTAS. 2010;10.
41. Friedman-Gohas M, Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, et al. FMRpolyG accumulates in FMR1 premutation granulosa cells. *J Ovarian Res* 2020;13(1):22.
42. Elizur SE, Dratviman-Storobinsky O, Derech-Haim S, et al. FMR6 may play a role in the pathogenesis of fragile X-associated premature ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol* :5.
43. Buijsen RAM, Visser JA, Kramer P, et al. Presence of inclusions positive for polyglycine containing protein, FMRpolyG, indicates that repeat-associated non-AUG translation plays a role in fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2016;31(1):158–168.
44. Spath MA, Feuth TB, Allen EG, et al. Intra-individual stability over time of standardized anti-Müllerian hormone in FMR1 premutation carriers. :7.
45. Rohr J, Allen EG, Charen K, et al. Anti-Müllerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. :6.
46. Pastore LM, Christianson MS, McGuinness B, Vaught KC, Maher JY, Kearns WG. Does the FMR1 gene affect IVF success? *Reproductive BioMedicine Online* 2019;38(4):560–569.
47. Corrigan EC, Nelson LM, Raygada MJ, Vanderhoof VH. A woman with spontaneous premature ovarian failure gives birth to a child with fragile X syndrome. 2005;84(5):4.

48. Reches A, Malcov M, Ben-Yosef D, Azem F, Amit A, Yaron Y. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome: is there increased transmission of abnormal FMR1 alleles among female heterozygotes? *Prenat Diagn* 2008;5.
49. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertility and Sterility* 2007;87(3):456–465.
50. Apessos A, Abou-Sleiman PM, Harper JC, Delhanty JDA. Preimplantation genetic diagnosis of the fragile X syndrome by use of linked polymorphic markers. *Prenat Diagn* 2001;8.
51. Avraham S, Almog B, Reches A, et al. The ovarian response in fragile X patients and premutation carriers undergoing IVF–PGD: reappraisal. :4.
52. Ranisavljevic N, Hess M, Castelli C, et al. Are ovarian response and pregnancy rates similar in selected FMR1 premutated and mutated patients undergoing preimplantation genetic testing? *J Assist Reprod Genet* :9.
53. Platteau P, Sermon K, Seneca S, Steirteghem AV, Devroey P, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis for fragile Xa syndrome: difficult but not impossible. :6.
54. Tsafir A, Altarescu G, Margalioth E, et al. PGD for fragile X syndrome: ovarian function is the main determinant of success. *Human Reproduction* 2010;25(10):2629–2636.
55. McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A, Abrams L, Bennett RL, Pettersen BJ. Genetic Counseling for Fragile X Syndrome: Updated Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. :22.
56. Baker VL, Rone HM, Adamson GD. Genetic evaluation of oocyte donors: recipient couple preferences and outcome of testing. 2008;90(6):8.
57. Haham LM, Avrahami I, Domniz N, et al. Preimplantation genetic diagnosis versus prenatal diagnosis—decision-making among pregnant FMR1 premutation carriers. *J Assist Reprod Genet* 2018;5.
58. Vianna-Morgante AM. Twinning and premature ovarian failure in premutation fragile X carriers. *American Journal of Medical Genetics* :1.
59. Dean DD, Agarwal S, Muthuswamy S. Defining the role of FMR1 gene in unexplained recurrent spontaneous abortion. *J Assist Reprod Genet* :6.
60. Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* :6.
61. National Fragile X Foundation. Fragile X-associated primary ovarian insufficiency. 2018;11.
62. Milá M, Ramos F, Tejada MI. Guía clínica de las enfermedades asociadas al gen FMR1: síndrome X frágil, insuficiencia ovárica primaria y síndrome de temblor-ataxia. *Medicina Clínica* 2014;142(5):219–225.
63. Amiri K, Hagerman RJ, Hagerman PJ. Fragile X–Associated Tremor/Ataxia Syndrome: An Aging Face of the Fragile X Gene. *ARCH NEUROL* 2008;65(1):7.
64. Hall D, Berry-Kravis E, Jacquemont S, et al. Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 2005;
65. Al-Hinti JT, Nagan N, Harik SI. Fragile X Premutation in a Woman With Cognitive Impairment, Tremor, and History of Premature Ovarian Failure. :3.
66. Cabal-Herrera AM, Tassanakijpanich N, Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ. Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS): Pathophysiology and Clinical Implications. *IJMS* 2020;21(12):4391.
67. Rodríguez-Revenga L, Madrigal I, Pagonabarraga J, et al. Penetrance of FMR1 premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur J Hum Genet* 2009;17(10):1359–1362.
68. Saldarriaga-Gil W, Rodríguez-Guerrero T, Fandiño-Losada A, Ramírez-Cheyne J. Tremor-Ataxia Syndrome and Primary Ovarian Insufficiency in an FMR1 Premutation Carrier. *Colombia Médica* 2017;48:4.
69. Cohen S, Masyn K, Adams J, et al. Molecular and imaging correlates of the fragile X–associated tremor/ ataxia syndrome. :7.
70. Hagerman PJ, Greco CM, Hagerman RJ. A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers. *Cytogenet Genome Res* 2003;9.

71. Mila M, Alvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodriguez-Revenga L. Fragile X syndrome: An overview and update of the *FMR1* gene. *Clin Genet* 2018;93(2):197–205.
72. Beke A, Piko H, Haltrich I, et al. Study of patterns of inheritance of premature ovarian failure syndrome carrying maternal and paternal premutations. *BMC Medical Genetics* 2018;9.
73. Hundscheid RDL, Sistermans EA, Thomas CMG, et al. Imprinting Effect in Premature Ovarian Failure Confined to Paternally Inherited Fragile X Premutations. *Am J Hum Genet* 2000;6.
74. Sherman SL. Premature Ovarian Failure among Fragile X Premutation Carriers: Parent-of-Origin Effect? *Am J Hum Genet* 2000;3.
75. AM Vianna-Morgante, Costa S. Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X. *Am J Hum Genet*. 2000;
76. Murray A, Ennis S, Morton N. No evidence for parent of origin influencing premature ovarian failure in fragile X premutation carriers. *Am J Hum Genet* 2000;
77. Ashley-Koch AE, Robinson H, Glicksman AE, et al. Examination of Factors Associated with Instability of the *FMR1* CGG Repeat. *Am J Hum Genet* 1998;10.
78. Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. Fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 2005;6.
79. Lieb-Lundell C. Three Faces of Fragile X. *Phys Ther* 2016;36.
80. American College of Obstetricians and Gynecologists. Carrier Screening for Genetic Conditions. (691):15.
81. Liu XS, Wu H, Krzisch M, et al. Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the *FMR1* Gene. *Cell* 2018;172(5):979-992.e6.
82. Rajendra K, Bringman JJ, Ward J, Phillips OP. Who should be tested for fragile X carriership? A review of 1 center's pedigrees. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2008;3.
83. Ryyanen M, Heinonen S, Makkonen M, Kajanoja E, Mannermaa A, Pertti K. Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies. *European Journal of Human Genetics* 1999;5.
84. Pessoa R, Berkenstadt M, Cuckle H, et al. Screening for fragile X syndrome in women of reproductive age. *Prenat Diagn* 2000;4.
85. Mak AS, Leung K. Challenges in prenatal screening and counselling for fragile X syndrome. *Hong Kong Med J* 2017;23(2):2.
86. Berkenstadt M, Ries-Levavi L, Cuckle H, Peleg L, Barkai G. Preconceptional and prenatal screening for fragile X syndrome: Experience with 40 000 tests. *Prenat Diagn* 2007;4.
87. Monaghan KG, Lyon E, Spector EB. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in medicine* :12.
88. Hayward BE, Kumari D, Usdin K. Recent advances in assays for the Fragile X-related disorders. *Hum Genet* 2017;23.
89. Cuckle H, DPhil, Maymon R. Development of prenatal screening—A historical overview. *Seminars in perinatology* 2016;11.
90. Cheng YK, Lin CS, Kwok YK, et al. Identification of fragile X pre-mutation carriers in the Chinese obstetric population using a robust *FMR1* polymerase chain reaction assay: implications for screening and prenatal diagnosis. 2017;23(2):7.
91. Strom CM, Crossley B, Redman JB, et al. Molecular testing for Fragile X Syndrome: Lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory. *Genetics IN Medicine* 2007;9(1):6.
92. Lekovich J, Man L, Xu K, et al. CGG repeat length and AGG interruptions as indicators of fragile X-associated diminished ovarian reserve. *Genet Med* 2018;20(9):957–964.
93. Gatta V, Gennaro E, Franchi S, et al. MS-MLPA analysis for *FMR1* gene: evaluation in a routine diagnostic setting. 2013;7.
94. Finucane B, Lincoln S, Bailey L, Martin CL. Prognostic dilemmas and genetic counseling for prenatally-detected fragile X gene expansions. :19.
95. Musci TJ, Mgc KM. Prenatal Carrier Testing for Fragile X: Counseling Issues and Challenges. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2010;10.

96. Yaron Y, Musci T, Cuckle H. Current controversies in prenatal diagnosis 1: screening for fragile X syndrome. *Prenatal Diagnosis* 2013;3.
97. Musci TJ, Caughey AB. Cost-effectiveness analysis of prenatal population-based fragile X carrier screening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005;8.
98. Fanos JH, Spangner KA, Musci TJ. Attitudes toward prenatal screening and testing for Fragile X. *Genetics IN Medicine* 2006;8(2):5.
99. Sermon K, Seneca S, Rycke MD, et al. PGD in the lab for triplet repeat diseases — myotonic dystrophy, Huntington's disease and Fragile-X syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001;9.
100. Malcov M, Naiman T, Yosef DB, et al. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome using multiplex nested PCR. *Reproductive BioMedicine Online* 2007;14(4):515–521.
101. Chen M, Zhao M, Lee CG, Chong SS. Identification of microsatellite markers <1 Mb from the FMR1 CGG repeat and development of a single-tube tetradecaplex PCR panel of highly polymorphic markers for preimplantation genetic diagnosis of fragile X syndrome. *Genetics in medicine* :7.
102. Kieffer E, Nicod J-C, Gardes N, et al. Improving preimplantation genetic diagnosis for Fragile X syndrome: two new powerful single-round multiplex indirect and direct tests. *Eur J Hum Genet* 2016;24(2):221–227.
103. Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, et al. Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat Diagn* 1999;8.
104. Cronister A, Teicher J, Rohlfes EM, Donnenfeld A, Hallam S. Prevalence and Instability of Fragile X Alleles. *Obstet Gynecol* 2008;111(3):6.
105. Kallinen J, Heinonen S, Mannermaa A, Ryyanen M. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome and the risk of expansion of a premutation. *Clinical Genetics* 2000;5.
106. Oostra BA, Willemsen R, Oosterwijk J, Galjaard H. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. *Lancet* 1996;
107. Willemsen R, Bontekoe CJ, Severijnen L-A, Oostra BA. Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum Genet* 2002;110(6):601–605.