

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

PATRÍCIA MARIA FRITSCH

**Triagem Molecular para Síndrome do X Frágil em Pacientes  
com Deficiência Mental atendidos no HUB/UnB**

Brasília-DF, 2011

PATRÍCIA MARIA FRITSCH

## Triagem Molecular para Síndrome do X Frágil em Pacientes com Deficiência Mental atendidos no HUB/UnB

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Dra Íris Ferrari

Co-Orientadora: Dra Juliana Forte Mazzeu

Brasília-DF, 2011

## DEDICATÓRIA

À Minha Família.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida e à FAP-DF, pelo financiamento do projeto.

À minha orientadora, Dra. Íris Ferrari, por abrir as portas do laboratório e me dar a oportunidade de trabalhar em sua equipe. Por instigar minha curiosidade e vontade de fazer ciência.

À minha coorientadora, Dra. Juliana Forte Mazzeu, pelo engajamento, dedicação, brilhantismo e amizade.

Aos meus colegas de laboratório e de estudo, pelas discussões e trocas de experiências vividas e pelo convívio. Em especial a técnica de laboratório, Nilza, pelos conselhos e trabalhos. À equipe de médicas geneticistas que participaram ativamente nesse projeto.

Ao Dr. César de Sá (*in memorium*) e Dra. Beatriz Dolabela de Lima, por me receber em seu laboratório e proporcionar grande parte do desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Riccardo Pratesi e Dra. Lenora Gandolfi por me “adotar” em seu laboratório durante a execução final dos experimentos desse projeto e por permitir o convívio e futuras parcerias com sua equipe. Rodrigo, Lucas, Fernanda, Rosa e estagiários, muito obrigada!

A DEUS pelo dom da vida e ao Universo, que de uma forma ou de outra sempre me colocam onde eu quero estar.

Ao meu pai, pelo melhor pai que consegue ser, pelo exemplo de caráter, de vida e de luta que sempre me deu.

À minha mãe, pela criação, educação e amor que sempre me dá. Pelos sonhos que me ensinou a viver e pela vida que me ensinou a sonhar.

Aos meus irmãos, Santiago, Daniela e Luana pelo exemplo de coragem, de bondade, de dedicação que são e me dão todos os dias.

Ao homem que eu amo, Eduardo Lourenço da Silva, pela amizade, companheirismo, dedicação, atenção, por todo amor que me dá. Por estar do meu lado nos meus momentos de crise, de tristeza, de alegria e de superação. Por ser presente em minha vida em todos os momentos e por tantas formas me fazer feliz. Estendo minha gratidão aos seus pais, Paulo e Marlene, sua irmã Paulinha e Júnior pelas orações e exemplo de alegria, simplicidade e felicidade que me dão.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram a apostar na ciência, que tornaram esses últimos dois anos emocionantes, cheios de vida e de alegria. Quero agradecer especialmente a colega Lilian Barros Queiroz, pela amizade, pelas conversas, pelas bancadas e pipetas repartidas. Ao meu querido amigo e colega Rodrigo Almeida, pelo exemplo de paixão pela ciência, pelo ombro amigo e palavra certa sempre que eu precisasse e por proporcionar parcerias e aproximação com a equipe do laboratório de pesquisa em doença celíaca. Ao querido amigo de graduação e de mestrado, Lucas Malta (chamado carinhosamente de Lucas Buarque) por me ensinar, pelo exemplo, a ter paciência e acreditar que o trabalho que se faz com dedicação sempre trará alegria. Agradeço a minha amiga Valquíria pela presença, amizade e fé. À Neuzinha pela amizade, exemplo de vida e determinação que é, e por todos os bons encontros proporcionados onde a amizade provou ser forte mesmo com o passar do tempo, mesmo com diferentes caminhos tomados, afinal amizade é amizade.

Aos amigos de infância, de estudo, de aventuras, de shows, de conversas, de encontros, de alegrias e filosofia: Rodrigo, Lílian, Juliana, Gabriel horta, Catarina Franco, Ana Paula Barbosa, Aline Macari, Franci Santin, Sônia, Lara, Anderson, Jesus, Flávio, Silvieni, Getúlio, Vinícius, Erich, Fafá, Renata, Angelita, Mano, Mateus, Henrique, Rafael, entre tantos outros que, em momentos e formas diferentes, foram parte muito importante para a construção do meu ser e das minhas conquistas.

A todos, meu carinho, ternura, amizade e gratidão.

# **ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>SÍNDROME DO X FRÁGIL</b> .....	<b>5</b>
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SXF .....	9
FMR1: GENE E PRODUTO .....	12
DIAGNÓSTICO E TRIAGEM MOLECULAR PARA SXF.....	23
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>28</b>
PRINCIPAL: .....	28
ESPECÍFICO: .....	28
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>PACIENTES</b> .....	<b>29</b>
COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA .....	31
<b>PCR DA REGIÃO CGG EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (PCR CGG-EA) .....</b>	<b>32</b>
ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	34

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS EM AGAROSE DA PCR PARA A SXF.....	34
<b>PCR CGG EM ELETROFORESE CAPILAR (PCR CGG-EC).....</b>	<b>38</b>
ANÁLISE DE MARCADORES DE MICROSSATÉLITE PRÓXIMOS AO GENE FMR1 .....	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>TRIAGEM MOLECULAR PARA SXF EM PACIENTES COM DM – PROPÓSITOS.....</b>	<b>45</b>
PCR CGG-EA DO GENE FMR1 – PROPÓSITOS .....	46
PCR CGG-EC EM PROPÓSITOS.....	50
<b>TRIAGEM MOLECULAR PARA SXF EM FAMILIARES DE PACIENTES COM SXF .....</b>	<b>53</b>
PCR CGG-EA DO GENE FMR1 EM FAMILIARES .....	53
PCR CGG-EC EM FAMILIARES .....	56
<b>AVALIAÇÃO DA PCR CGG-EA .....</b>	<b>62</b>
<b>AVALIAÇÃO DA PCR CGG-EC .....</b>	<b>65</b>
<b>HEREDOGRAMAS.....</b>	<b>67</b>
FAMÍLIA A:.....	69
FAMÍLIA B:.....	70
FAMÍLIA C:.....	71
FAMÍLIA D:.....	73
FAMÍLIA E:.....	74
FAMÍLIA F:.....	75
FAMÍLIA G:.....	76



FAMILIA H: .....	77
FAMÍLIA I: .....	78
FAMÍLIA J: .....	79
<b>ANÁLISE DOS MISCROSSÁTELITES DXS548 E FRAXAC1 .....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## *Índice de Figuras*

Figura 1: Par de cromossomos X.....	6
Figura 2: Representação esquemática do gene <i>FMRI</i> , região 5'UTR, alelo normal, alelo prémutado e mutação completa. ....	14
Figura 3: A função de FMRP e seu efeito patogênico na sinapse.....	17
Figura 4: Mecanismos propostos como causa das diferentes patologias relacionadas com a expansão de trinucleotídeos CGG na região 5'UTR do gene <i>FMRI</i> .....	21
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR de mulheres triadas para SXF pelo laboratório de genética clínica UNB, 2010.....	25
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando a amplificação das amostras com número conhecido de repetições CGG em PCR padronizado antes de iniciar a triagem.....	33
Figura 7: Amplificação do gene <i>MTHFR</i> por PCR CGG-EA para confirmação do diagnóstico em pacientes com suspeita de SXF.....	36
Figura 8: Resultado da eletroforese em capilar após amplificação da região CGG do gene <i>FMR1</i> .....	39
Figura 9: Localização dos STRs no sítio frágil FRAXA.....	41

Figura 10: PCR CGG-EA.....62

Figura 11: Amplificação da repetição CGG em mulheres. ....63

## *Índice de Tabelas*

Tabela 1: Lista de características físicas, comportamentais e anamnéticas freqüentemente encontradas em pacientes do sexo masculino com SXF.....	10
Tabela 2: <i>Checklist</i> de Triagem da Síndrome do Cromossomo X frágil para a população brasileira.....	11
Tabela 3: Distribuição da freqüência do total de amostras de propósitos quando ao sexo.....	45
Tabela 4: Freqüência obtida quanto à conclusividade do diagnóstico por PCR CGG-EA.....	46
Tabela 5: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA em amostras masculinas.....	47
Tabela 6: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA do gene FMR1 em amostras de pacientes do sexo feminino.....	48
Tabela 7: Total de pacientes com DM (propósitos) testados por PCR CGG-EA da repetição CGG do gene <i>FMR1</i> .....	50
Tabela 8: PCR CGG-EC de pacientes (propósitos) inconclusivos em PCR CGG-EA.....	50

Tabela 9: Alelo e número de repetições CGG em Homens propósitos testados em eletroforese capilar.....	52
Tabela 10: Distribuição da freqüência do total de amostras de familiares quando ao sexo.....	53
Tabela 11: Freqüência obtida quanto à conclusividade do diagnóstico por PCR CGG-EA.....	54
Tabela 12: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA em amostras de familiares do sexo masculino.....	55
Tabela 13: Classificação de Familiares do sexo feminino de SXF identificados por PCR CGG-EA.....	55
Tabela 14: Total de familiares de pacientes com SXF testados pela PCR CGG-EA.....	56
Tabela 15: Amostras inconclusivas de Familiares testados pela PCR CGG-EC.....	57
Tabela 16: Alelos encontrados por eletroforese capilar das amostras inconclusivas de familiares de SXF.....	58
Tabela 17: Alelo e número de repetições CGG em familiares pré-mutados testados em eletroforese capilar.....	59
Tabela 18: Alelos encontrados nas amostras das mulheres inconclusivas de propósitos e familiares de SXF em eletroforese capilar.....	60
Tabela 19: Alelos, em unidades de base (ub), encontrados com correspondência e classificação com o número de repetições CGG.....	66

Tabela 20: PCR DXS548 e FRAXAC1 analisadas em eletroforese capilar.....81

## **RESUMO**

A síndrome do X frágil (SXF) é a causa hereditária mais comum de Deficiência Mental familiar. É causada pela expansão da repetição CGG na região 5' não traduzida do gene *FMR1*. Indivíduos normais apresentam entre 20 e 50 repetições CGG enquanto que indivíduos com pré-mutação apresentam de 55 a 200 repetições e pacientes X frágil apresentam mais de 200 repetições (mutação completa) que levam à hipermetilação e inativação do gene *FMR1*. O presente trabalho teve como objetivo implantar uma metodologia de triagem molecular para a SXF em portadores de deficiência mental DM atendidos pelo Serviço de Genética Clínica do HUB/UnB. Foram investigados 128 indivíduos com DM e 29 familiares de afetados pela SXF. A metodologia utilizada, baseada na PCR, associou duas técnicas para visualização do produto amplificado, Eletroforese em gel de agarose (PCR CGG-EA) e Eletroforese Capilar (PCR CGG-EC). Foi possível distinguir pré-mutações maiores que 112 repetições CGG. Dos 128 pacientes com DM testados 8 apresentaram resultado positivo para a presença de mutação completa. Em 25 das 30 mulheres testadas, foi possível determinar heterozigose. A associação das técnicas PCR CGG-EA e PCR CGG-EC se mostrou eficaz na identificação de mulheres heterozigotas, indivíduos com mutação completa, pré-mutação e alelos normais, reduzindo em 83% a necessidade de triar por Southern Blotting.

Palavras-chave: Síndrome do X Frágil; *FMR1*; Deficiência Mental.

## **ABSTRACT**

The Fragile X syndrome (SXF) is one of the most common inheritable causes of mental retardation (MR). It is caused by expansion of the CGG repeat in the 5' untranslated region of the *FMR1* gene. Normal individuals have between 20 and 50 CGG repeat, while individuals with premutation have from 55 to 200 repeat and fragile X patients shown more than 200 repeat (full mutation) that lead to hypermethylation and inactivation of the *FMR1* gene. The objective of this study is to implement a molecular selection methodology for SXF in bearers of MR assisted by the Clinical Genetics Service of HUB/UnB. One hundred and twenty eight mentally retarded individuals and 29 family members affected by SXF were investigated. Based on PCR, the methodology utilized associated two techniques for visualization of the amplified product: electrophoresis in agarose gel (PCR CGG-EA) and Capillary Electrophoresis (PCR CGG-EC). It was possible to distinguish premutations greater than 112 CGG repeats. Of the 128 patients with MR tested, 8 showed positive results for the presence of the full mutation. In 25 of the 30 women tested, it was possible to define heterozygous. Association of the PCR CGG-EA and PCR CGG-EC techniques was shown to be efficacious in identifying individual heterozygotic women with complete mutation, premutation and normal alleles, thus reducing the need for sample to be tested by to Southern blotting of 83%.

Key-Word: Fragile X syndrome; *FMR1*; Mental Retardation.



## ***INTRODUÇÃO***

A Deficiência Mental (DM) é considerada um estado incompleto ou inibido de desenvolvimento do intelecto e sua manifestação ocorre antes dos 18 anos de idade, envolvendo prejuízo das funções cognitivas, lingüísticas, motoras e sociais, que são componentes da inteligência do indivíduo, (World Health Organization, Geneva, 1992). Uma das características principais da DM é o mau funcionamento ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. O indivíduo apresenta rendimento intelectual inferior à média, acompanhado de limitações nas habilidades de comunicações, sociais e acadêmicas, nos cuidados consigo mesmo, na vida doméstica, no uso de recursos comuns, na auto-suficiência, no trabalho, no lazer e na saúde (American Psychiatric Association, Washington, D.C, 1994).

A classificação da Deficiência Mental em leve, moderada, grave e profunda é feita de acordo com o quociente de inteligência (QI) do portador, calculado por meio de testes padronizados, onde o desempenho inferior ou próximo a 70, na curva de distribuição do QI na população, é considerado Deficiência Mental e superior a 130 é considerada superdotação. O DM é considerado leve quando o QI varia de 50 a 69 a esquerda da curva de distribuição. Aproximadamente 85% dos portadores de Deficiência Mental apresentam a forma leve e a idade mental varia de 9 a 11 anos. Na Deficiência Mental moderada o QI

situa-se entre 35 a 49 na curva, e afeta aproximadamente, 10% dos portadores. O desempenho destes é equivalente ao de uma criança com idade entre 6 e 8 anos. Estima-se que a forma grave de Deficiência Mental ocorra de 3% a 4% dos indivíduos afetados. A idade mental, nesse caso, equivale à de uma criança de 3 a 5 anos. Já a Deficiência Mental profunda é considerada quando o QI está abaixo de 20 na curva. Esta é a forma mais rara do distúrbio, que afeta de 1% a 2% dos portadores e a idade mental desses indivíduos é inferior a três anos (American Psychiatric Association, Washington, D.C, 1994).

Geralmente, o primeiro diagnóstico de DM é realizado quando o portador passa a demonstrar comportamento social não adequado, hiperatividade ou agressividade. Não existe cura disponível para a maioria dos casos de DM, havendo tratamentos medicamentosos ou nutricionais que buscam controlar os sintomas e o surgimento de outras doenças associadas (Ritney, 2003). Porém a identificação de um diagnóstico associado ao aconselhamento genético, frequentemente, ajuda a família a compreender o prognóstico e a estimativa do risco de recorrência da doença (Kabra & Gulati, 2003).

A prevalência de DM na população mundial varia de 1% a 3% (Croen *et al.*, 2001; Kabra *et al.*, 2003). A ocorrência de DM é mais comum nos países em desenvolvimento, onde se acredita ser maior a incidência de agressão cerebral por falta de oxigenação no recém-nascido, desnutrição, infecções cerebrais na primeira infância. No Brasil, de acordo com o censo de 2000, pelo menos 1.16% da população (2.8 milhões de pessoas) têm

deficiência mental o que, provavelmente, é subestimado, já que a prevalência em países em desenvolvimento é geralmente cerca de três vezes maior que em países desenvolvidos (Faria, 2006).

Os fatores que desencadeiam a Deficiência Mental são variados. Em 30% a 40% dos casos, é impossível identificar sua origem. Dos casos diagnosticados, em 30% as causas estão relacionadas a problemas no desenvolvimento do feto (como doenças genéticas, desnutrição e infecções maternas durante a gestação e uso de drogas pela gestante); o restante está relacionado com incidentes no parto, ou no primeiro mês de vida do bebê, como prematuridade, oxigenação cerebral insuficiente, entre outros. Crianças criadas em ambiente com falta de estímulos, o que prejudica o desenvolvimento mental do indivíduo, respondem por 15-20% dos casos de DM (Ramakers, 2002).

A DM de causa genética pode ser ocasionada por anomalias constitucionais, como deleções, duplicações ou aneuploidias cromossômicas que afetam múltiplos genes (Chelly *et al.*, 2006; Inlow & Restifo 2004). A DM pode ser categorizada como sindrômico quando a criança apresenta características dismórficas associadas que podem levar à identificação de uma síndrome genética. A mais freqüente é a síndrome de Down com 1 caso para 500 nascidos vivos (Stevenson, 2000).

A DM pode ainda estar relacionada a mutações em genes individuais que indicam doença genética autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X.

Aproximadamente 80 genes envolvidos com a DM ligada ao X foram identificados por meio de análise de ligações genéticas, clonagem posicional, análise de genes candidatos ou estudos citogenéticos (Chiurazzi *et al.*, 2008; Ropers & Hamel, 2005).

## *Síndrome do X Frágil*

Desde o final do século XIX observações apontaram a preponderância significativa de homens em instituições para pessoas com comprometimento intelectual o que despertou a atenção de médicos e pesquisadores. A frequência de homens, nessas instituições, chegava a ser 25% maior do que a de mulheres (Sherman, 1985). Devido ao grande número de doenças associadas à DM serem determinadas por genes do cromossomo X, a DM é mais frequente no sexo masculino, na proporção de 1,3 a 1,9 homens para 1 caso em mulheres (Kabra & Gulati, 2003). A causa mais comum de Deficiência Mental ligado ao X é a Síndrome do Cromossomo X frágil (SXF, OMIM 300624) caracterizado por Deficiência Mental moderada a profunda nos homens afetados e geralmente, leve nas mulheres afetadas. Esta síndrome é também a principal causa de DM herdada.

Em 1943, Martin & Bell descreveram uma família com 11 homens afetados por DM ao longo de duas gerações, provenientes de mães intelectualmente normais. O histórico familiar era fortemente sugestivo de herança ligada ao cromossomo X.

Em 1969, Lubs estudou quatro meninos de uma mesma família em três gerações de DM e reportou a presença de um sítio frágil no braço longo do cromossomo X em 10% a 30% das células em metáfase, analisadas por citogenética. Lubs (1969) também observou

que as mães desses meninos apresentavam igualmente o sítio frágil, que foi denominado de cromossomo X marcador. Estudos citogenéticos associaram esse sítio frágil a Deficiência Mental familiar, como os relatos numa família brasileira onde o marcador citogenético também foi observado (Vianna-Morgante *et al.*, 1982).

Mais tarde, Lubs *et al* (1984) reportaram que esses mesmos meninos apresentavam peculiaridades morfológicas que eram facilmente associadas à síndrome como macrorquidia, orelhas proeminentes e rosto alongado. A partir de então o sítio frágil do cromossomo X foi identificado em várias famílias e o associaram ao quadro clínico da síndrome até então denominada de Martin-Bell (Sutherland e Ashforth, 1979; Howard-Peebles *et al.*, 1979 e Vianna-Morgante *et al.*, 1982). Harrison e colaboradores, em 1983, localizaram esse sítio frágil na região Xq27.3 (Figura 1).

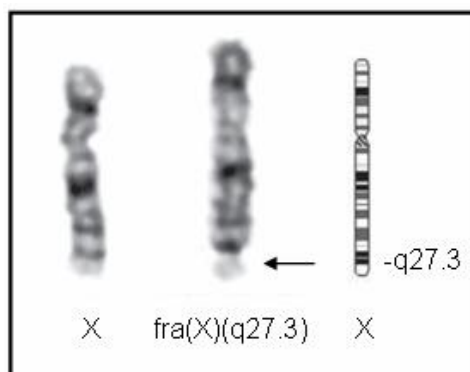


Figura 1: Par de cromossomos X. A seta indica o sítio frágil X na região Xq27.3. À direita, o ideograma do cromossomo X. Modificado de [www.genetics.com.au/pdf/factSheets/FS32.pdf](http://www.genetics.com.au/pdf/factSheets/FS32.pdf).

A incidência de SXF em população com DM é de 1:4000 para homens, enquanto que para mulheres a incidência é de 1:6000 (Turner *et al.*, 1996; De Vries *et al.*, 1997). A SXF é responsável por 3 a 6% da Deficiência Mental em meninos com história familiar positiva de Deficiência Mental não associada a malformações físicas congênitas (Mingroni-Netto, 1996; Jorde *et al.*, 2004).

O estudo das famílias com indivíduos afetados pela SXF revela um padrão incomum de herança da síndrome onde homens e mulheres que portavam a SXF apresentavam ou não as características da síndrome. Baseado no acometimento dos parentes, Sherman *et al.*, (1985) observaram que mulheres que manifestavam o quadro clínico da síndrome apresentavam maior risco de ter um filho com SXF do que as portadoras do gene alterado mas fenotipicamente normais e que filhas de homens portadores normais não eram afetadas. Os autores observaram também que a probabilidade de DM é aumentada à medida que a mutação é transmitida de geração para geração por uma mulher com fenótipo normal. (Sherman *et al.*, 1984). Essas peculiaridades da síndrome são conhecidas como o Paradoxo de Sherman.

Chakravarti (1992) e Morton e Macpherson (1992) criaram modelos populacionais para explicar a alta incidência da SXF na população. Verificaram que mesmo com a perda constante de alelos instáveis através de afetados, os alelos “protomutados” se mantinham na população com maior probabilidade de expansão dos trinucleotídeos para uma mutação

completa. Chakrvarti (1992) chegou a propor que tais alelos poderiam ser transmitidos inalterados por cerca de 90 gerações, o que explicaria em parte a alta incidência da mutação da SXF.

A SXF é responsável por, aproximadamente, 14% de todos os retardos mentais idiopáticos, no sexo masculino, e aparentemente incide de forma similar em todos os grupos étnicos (Turner *et al.*, 1996). Apesar dessa significativa prevalência, somente uma fração dos indivíduos afetados recebe diagnóstico apropriado, mesmo em países desenvolvidos.



## ***Características Clínicas da SXF***

A principal característica para a primeira suspeita de SXF em homens afetados é a presença de Deficiência Mental, que compromete suas funções cognitivas e adaptativas, limitando no indivíduo afetado a capacidade de aprendizado, de movimentação e de linguagem (Maes *et al.*, 2000). O QI num adulto do sexo masculino com a mutação completa é aproximadamente 40 (Merenstein *et al.*, 1996).

Nas mulheres afetadas, os achados fenotípicos são mais discretos e variáveis em virtude da inativação aleatória de um dos cromossomos X, causando efeito compensatório benéfico sobre a expressividade do gene mutado (Riddle *et al.*, 1998). Dessa forma, mulheres com a mutação completa apresentam, geralmente, menor prevalência de DM, quando comparadas com a de homens afetados (Rousseau *et al.* 1994). A maioria das mulheres afetadas apresenta déficit de atenção, impulsividade e dificuldade de aprendizado, entretanto, apenas parte delas apresenta DM (Hagerman, 1992).

As características fenotípicas encontradas em pacientes com SXF não se limitam ao DM mas incluem aspectos morfológicos e comportamentais. Para facilitar o diagnóstico clínico da SXF, Butler *et al.*, (1991) baseados nos trabalhos de Hagerman (1987) e Hagerman *et al.*,(1991) propuseram uma listagem de sinais e sintomas para avaliar as características físicas, comportamentais e anamnéticas dos pacientes com SXF. Essa lista

contém 15 das características encontradas com maior frequência em indivíduos afetados pela SXF, como mostra a Tabela 1.

Tabela 2: Lista de características físicas, comportamentais e anamnéticas frequentemente encontradas em pacientes do sexo masculino com SXF (Butler *et al.*,1991; Hagerman, 1997).

Características	Frequência %
Deficiência Mental (DM)	100
História familiar de DM ou autismo	73,7
Distúrbio de atenção	63,2
Hiperatividade	73,7
Contato visual pobre	36,8
Aversão ao contato físico	63,2
Linguagem repetitiva	52,6
Movimentos rítmicos das mãos e braços	47,4
Face alongada	64,0
Orelhas grandes e proeminentes	94,7
Prega simiesca ou linha de Sydney	36,8
Mordedura das mãos	36,8
Hiperextensibilidade articular (metacarpofalangeana)	57,9
Sulco plantar	83,3
Macrorquidismo	80,0

Christofolini *et al* (2009), estudaram 192 pacientes masculinos com idades entre 2 e 31 anos que apresentavam deficiência intelectual associada ou não a outros fatores, atendidos no Hospital São Paulo. Todos os pacientes possuíam cariótipo normal e os casos conhecidos de síndromes dismórficas e metabólicas foram excluídas. Baseando-se em *checklists* para triagem de SXF de Hagerman et al. (1991), Butler et al. (1991) e Laing et al. (1991), Christofolini *et al* (2009) propuseram um novo checklist para a população brasileira

composto por 10 itens: histórico familiar de deficiência intelectual, face alongada, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações dos dedos, testículo grande, prega palmar transversal, hábito de morder as mãos, movimentos rítmicos com as mãos, aversão a contato físico e pouco contato visual (Tabela 2). Problemas de comportamento como ansiedade, variação de humor, hiperatividade, impulsividade, e comportamento agressivo também são observados em pacientes com SXF (Hagerman *et al.*, 1991).

Tabela 2 – *Checklist* de Triagem da Síndrome do Cromossomo X frágil para a população brasileira. Fonte: Christofolini et al (2009).

---

Christofolini Checklist
Histórico familiar de deficiência mental
Face alongada
Orelhas proeminentes
Hiperextensibilidade de articulações
Macroorquidia
Prega Palmar transversa
Morder mãos
Movimentos rítmicos com as mãos
Aversão ao contato físico
Pouco contato visual

---

## ***FMRI: Gene e Produto***

Em 1991, três grupos de pesquisadores independentes uniram esforços para a identificação do gene responsável pela SXF. Através da clonagem de sondas de DNA que detectavam alterações no gene, Oberlé *et al.*, (1991), Verkerk *et al.*, (1991) e Yu *et al.*, (1991), localizaram o gene *FMRI* (*Fragile Mental Retardation I*) no sítio frágil do cromossomo X, na região Xq27.3. O gene *FMRI* apresenta 17 éxons num segmento genômico de aproximadamente 38 Kb (Sherman *et al.*, 1988; Snow *et al.* 1993; Eichler *et al.*, 1993). A SXF é causada pela repetição polimórfica do trinucleotídeo citosina-guanina-guanina (CGG) localizada na região 5' não traduzida (UTR) do éxon 1 e inclui todos os transcritos de *FMRI* (Verkerk *et al.*, 1993).

Na população normal, a repetição CGG é polimórfica e os indivíduos apresentam de 5 – 55 repetições CGGs, (Fu *et al.*, 1991). Em pacientes com X frágil, a repetição CGG encontra-se expandida, com mais de 200 repetições e nesse caso é chamado de mutação completa. A expansão da repetição CGG na mutação completa causa a hipermetilação da ilha CpG na região reguladora 5' do gene *FMRI*. Este aumento na metilação e a diminuição da acetilação das histonas 3 e 4 na região 5' do gene, levam à perda da expressão do gene e de seu produto (Coffee *et al.*, 1999). O silenciamento da transcrição do gene *FMRI* leva à

não produção da proteína FMRP, levando à manifestação da síndrome. (Verkerk *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Sutcliffe *et al.*, 1992).

Expansões não metiladas de 55-200 repetições CGG são chamadas de pré-mutação e, embora não causem DM são instáveis na meiose, podendo dessa forma expandir para uma mutação completa quando transmitidas matematicamente para as próximas gerações (Fu *et al.*, 1991; Nolin *et al.*, 2003). Alguns autores classificam as repetições CGG entre 40 e 55 como *Gray zone*, por estarem inseridos numa faixa intermediária pouco relacionada à transmissão instável entre gerações (Crawford *et al.*, 2000). O menor número observado de repetições CGG capaz de se expandir numa mutação completa na próxima geração é de 56 repetições (Fernandez-Carvajal *et al.*, 2009). Os alelos normais, pré-mutados e mutação completa, podem ser observados na Figura 2.

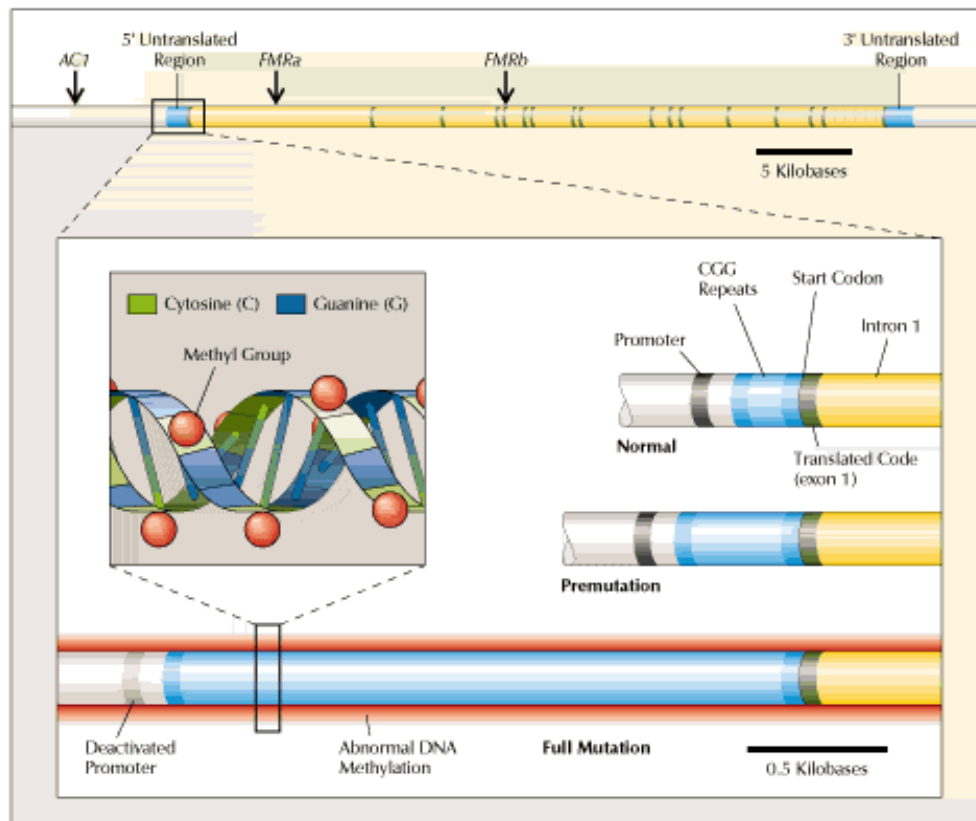


Figura 2: Representação esquemática do gene *FMR1*, região 5'UTR, alelo normal, alelo prémutado e mutação completa. Em azul, região polimórfica de repetições CGG e em detalhe grupo metil na expansão. Fonte: Stephen T. Warren. Hospital Practice 1997.

A FMRP é uma proteína intracelular de 70-80 kD que regula a expressão de várias proteínas. A FMRP está presente em várias linhagens celulares do cérebro e testículos, sendo particularmente abundante no citoplasma dos neurônios (Devys *et al.*, 1993). A FMRP é produzida próxima à sinapse, e está presente nos dendritos distais, onde sua

expressão se mostrou aumentada em resposta à ativação de neurotransmissores (Weiler *et al.*, 1997), e exerce papel importante no desenvolvimento de conexões sinápticas, o que explicaria sua relação com a Deficiência Mental (Wittenberger, *et al.*, 2007; Irwin *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 1997).

As propriedades de FMRP sugerem seu envolvimento na exportação nuclear, no transporte citoplasmático, bem como no controle da tradução de mRNAs (Jin & Warren, 2000). A proteína FMRP age como via transportadora de vários mRNAs, envolvidos na plasticidade sináptica e no desenvolvimento neuronal. A proteína associa-se a vários mRNAs produzidos por outros genes e também pelo FMR1, regulando a síntese das proteínas, que se formam a partir desses mRNAs, no sítio pós sináptico, indispensável na maturação normal da espinha dendrítica, que quando anormais, são observadas tanto em pacientes com SXF quanto em modelos animais FMR1 nocauteados (Comery *et al.*, 1997; Irwin *et al.*, 2000).

A proteína FMRP possui ligantes seletivos de RNAs e contém dois domínios KH (*K-protein homology*), KH e KH2 e um RGG Box (Siomi *et al.* 1993). A Proteína FMRP é predominantemente citoplasmática e mantém tanto um sinal de localização nuclear na porção amino-terminal NLS, (*nuclear location signal*), quanto um sinal de exportação nuclear NES, (*nuclear export signal*), o que dá à proteína a função de intermediadora entre o núcleo e o citoplasma (Siomi *et al.*, 1993; De Boulle *et al.*, 1993). A proteína associa-se à

poliribossomos de forma RNA-dependente formando um complexo RPN (de partículas ribonucleoproteínas mensageiras - mRNP) contendo FMRP, FRX1P, FRX2P, nucleolina, e três outras proteínas. Este complexo liga-se ao mRNA através da estrutura quaternária G do mRNA, que age como um alvo para FMRP e proporciona uma ligação seletiva através da FMRP. Essa interação faz com que FMRP funcione como fator de transcrição de uma série de mRNAs (Orr & Zogbbi, 2007). Baseado nestas funções, mutações no domínio KH2 impedem a associação com o mRNPs, causando a Síndrome do X frágil (Feng et al. 1997, Laggerbauer et al. 2001, Li et al. 2001).



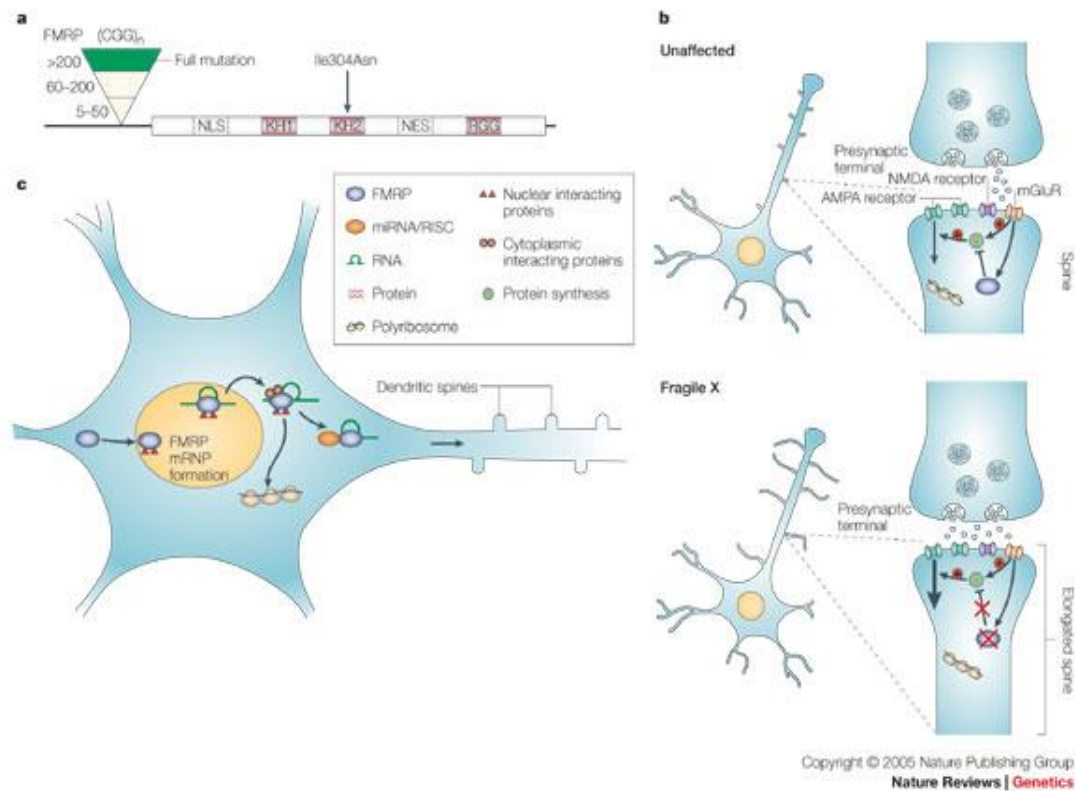


Figura 3: A função de FMRP e seu efeito patogênico na sinapse. Fonte: Orr & Zoghbi, 2007.

É importante notar que os portadores da pré-mutação com número grande de repetições, têm baixos níveis de proteína FMRP e níveis elevados de mRNA. Isso parece se dever à dificuldade de traduzir um mRNA com uma repetição CGG grande, o que levaria à diminuição na síntese da proteína FMRP. A célula passaria, então, a produzir mais mRNA, em uma tentativa de aumentar a síntese da proteína (Tassone *et al.*, 2000a; Tassone *et al.*, 2000b; Hagerman, 2002).

Em diferentes grupos étnicos estima-se que 1:1.000 homens e que 1:400 mulheres são portadores de pré-mutação (Sherman, 1985). Na população geral, Rousseau *et al* (1995) sugeriram que uma em cada 259 mulheres pode ser portadora da pré-mutação. Com o passar dos anos, percebeu-se que portadores da pré-mutação também têm risco de desenvolver uma doença neurodegenerativa progressiva que tem sintomas e sinais clínicos inteiramente distintos da SXF (Oostra e Willemsen, 2009). Essa síndrome foi denominada Síndrome de Tremor e Ataxia associada ao X frágil (FXTAS), em que indivíduos com mais de 50 anos, portadores de pré-mutação no gene *FMRI* têm probabilidade maior de desenvolver quadros clínicos neurodegenerativos de início tardio (Jacquemont *et al.*, 2004; Willemsen *et al.*, 2005).

O fenótipo de FXTAS foi primeiramente identificado em 2001, em cinco casos de homens portadores da pré-mutação no gene *FMRI* que apresentaram tremor de início entre 50 e 60 anos de idade. Esses indivíduos apresentavam tremor, discinesia branda, dificuldade para andar, escrever, manusear talheres, e rigidez facial (Hagerman *et al.*, 2001). Em 2004 foram relatadas cinco mulheres portadoras da pré-mutação que apresentavam sintomas e sinais de FXTAS, porém mais brandos, possivelmente, devido ao mecanismo de inativação do cromossomo X.

Outros sintomas e sinais também são encontrados frequentemente na FXTAS, como distúrbios da marcha, parkinsonismo e declínio cognitivo. A chance de desenvolver a

FXTAS aumenta com a idade, passando de 17% em homens com idade entre 50 e 59 anos, para 75% em homens com mais de 80 anos. A FXTAS tem penetrância estabelecida em 39% para homens portadores da pré-mutação, com prevalência estimada de 1:3000 homens com mais de 50 anos, na população geral (Hagerman e Hagerman, 2001; Hagerman *et al.*, 2001; Jacquemont *et al.*, 2004; Hagerman e Hagerman, 2004a).

Nas mulheres, a pré-mutação pode também estar associada à falência ovariana prematura (FOP) e menopausa precoce antes dos 40 anos de idade, presente em 20% das portadoras. O estudo multicêntrico de Allingham-Hawkins *et al.*, (1999) pesquisou 760 mulheres de famílias de SXF e encontrou 395 portadoras de pré-mutação sendo, 128 portadoras da mutação completa e 237 não portadoras. Nele, 16% das pré-mutadas apresentaram menopausa antes dos 40 anos de idade, que indica associação significativa entre menopausa precoce e portadora da pré-mutação.

Entre 109 mulheres com pré-mutação analisadas por Hundsheid et al. (2000), a FOP ocorria em 28% quando herdadas paternalmente e apenas 3,7% quando herdadas maternas. Os autores formularam a hipótese de um efeito de *imprinting* paterno para FOP em portadoras da pré-mutação.

A expressão de *FMRI* e de outros genes ligados ao X não é funcional durante a espermatogênese normal, onde o cromossomo X se torna condensado e inativo. A maioria dos genes são reativados durante as primeiras divisões celulares logo após a fecundação,

quando os dois cromossomos X estão ativos na mórula feminina. Entretanto, quando um gene de um cromossomo X paterno está presente, pode ocorrer um atraso na reativação desse cromossomo X paterno inativo durante o início do desenvolvimento embrionário estando apenas o alelo materno expresso nesse estágio crítico de desenvolvimento. Apesar de não haver evidências diretas de que proteínas FMRP anormais produzidas no ovócito ocasione reduzida produção de ovócitos, foi considerado possível que essa proteína exerça importante papel durante a ovogênese. Murray (2000) e Vianna-Morgante e Costa (2000) confirmaram a origem paterna na falência ovariana prematura em portadoras da pré-mutação.

Dessa forma, alterações no padrão de expressão do gene *FMRI* estão relacionadas com três alterações importantes com distintas características entre si. A Figura 4 ilustra que, em portadores da mutação completa, a SXF é causada por um mecanismo de perda de função pelo bloqueio total da transcrição de *FMRI* e da tradução de FMRP. Em contrapartida, portadores da pré-mutação apresentam ganho de função com o aumento de transcritos de *FMRI*. Devido à dificuldade em traduzir um mRNA com repetição CGG grande, a síntese de FMRP é diminuída e na tentativa de aumentar a produção da proteína a célula passa a produzir mais mRNA, resultando em níveis elevados de *FMRI* mRNAs, causando FOP ou FXTAS (Tassone *et al.*, 2000a; Tassone *et al.*, 2000b; Hagerman, 2002; Jacquemont *et al.*, 2003; Ostra & Willemsen, 2009).

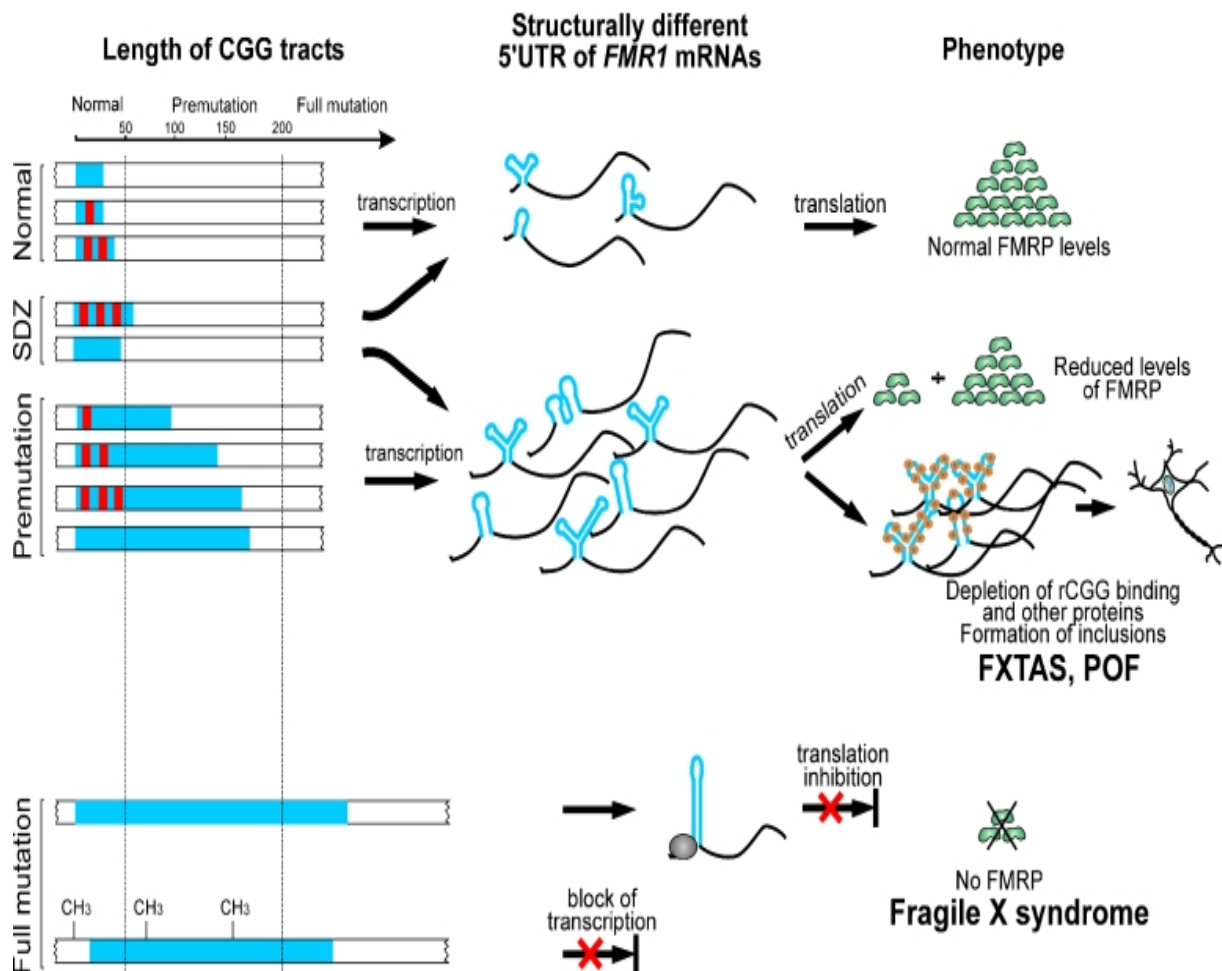


Figura 4: Mecanismos propostos como causa das diferentes patologias relacionadas com a expansão de trinucleotídeos CGG na região 5'UTR do gene *FMR1*. Campo esquerdo da figura representam o tamanho da região CGGs e as faixas azuis indicam o número de repetições: normal, Gray-zone, pré-mutação e mutação completa. O campo central da imagem representa os mRNAs transcritos a partir de cada polimorfismo da repetição CGG, e a mutação completa sem transcrito. No campo direito da imagem o produto e conseqüente relação entre a condição clínica e os polimorfismos. O alelo normal produzindo níveis normais de proteína, o alelo pré-mutado produzindo pouca proteína e níveis elevados de

transcritos, resultando nas condições propícias para o desenvolvimento de FXTAS e FOP, e a mutação completa e ausência da proteína e conseqüente SXF. Fonte: Napierala *et al.*, 2005.

## ***Diagnóstico e Triagem molecular para SXF***

Embora não exista nenhum elemento que isoladamente possa ser considerado como característica específica da SXF, o conjunto de características apresentadas por estes pacientes permite, na maior parte das vezes, que se realize o rastreamento dos possíveis portadores da SXF. Além dos sinais e sintomas clínicos, se faz necessário a realização de testes moleculares para certificar o diagnóstico.

Os testes comumente utilizados baseiam-se na detecção da presença ou ausência do sítio frágil FRAXA através da citogenética e da utilização de testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e *Southern Blotting* para a detecção da mutação do gene *FMRI* e determinação do número de repetições do trinucleotídeo CGG em pacientes com suspeita de SXF ou da pré-mutação.

A técnica de PCR é um método *in vitro* que permite a amplificação de um gene específico ou de uma região do DNA. Para a reação da PCR são necessárias a presença da amostra de DNA, par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), quatro deoxinucleotídeos trifosfato (DNTPs), enzima taq-polimerase e uma solução tampão. Os primers, ou iniciadores, devem ser específicos e complementares às extremidades 5´da região do DNA que se pretende amplificar. No primeiro ciclo da PCR, os componentes da reação são submetidos ao aquecimento para a desnaturação da fita dupla do DNA, seguidos de

resfriamento a uma temperatura específica para o anelamento dos primers na região complementar homóloga do DNA, e então, aquecida novamente para a extensão do DNA, para que a enzima adicione nucleotídeos livres e sintetize nova fita do DNA. Uma vez que o produto recém sintetizado também é complementar e capaz de se ligar a iniciadores, cada ciclo sucessivo dobra a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior, sintetizando exponencialmente DNA sucessivamente.

A PCR para a SXF feita em pacientes do sexo masculino com DM e em familiares de afetados, baseia-se na amplificação da região de repetições CGG e é considerada uma técnica precisa que possui alta sensibilidade e especificidade, versátil e de baixo custo. Embora amplamente utilizada, a PCR para SXF identifica precisamente indivíduos masculinos normais, em que há amplificação da região CGG do gene *FMRI*, e indivíduos masculinos afetados, em que não há amplificação devido à grande expansão da região CGG. Dessa forma, o produto da PCR desses indivíduos, quando visualizados em gel de agarose, apresenta um padrão específico de banda que diferencia homens normais de afetados pela presença ou ausência do produto amplificado respectivamente. No entanto, em indivíduos femininos o diagnóstico para a SXF costuma ser inconclusivo.

A maior dificuldade encontrada na PCR para SXF está em definir o diagnóstico molecular para as mulheres, uma vez que somente elas possuem dois alelos para o gene *FMRI*. Isto implica em diferenciar entre homozigose, com dois alelos normais com mesmo



número de repetições CGG de heterozigose, com um alelo normal e outro mutado, ou com grande pré-mutação, como pode ser observado na Figura 5. Uma mulher normal com alelos em heterozigose apresenta dois alelos, um de cada cromossomo X, que podem ser visualizados em gel de agarose pela presença de duas bandas menores que 45 repetições CGG de diferentes tamanhos (Figura 5 C). A mulher com alelos em homozigose normal e a heterozigota portadora da mutação completa em um de seus alelos apresentam ambas, apenas uma banda visualizada no gel de agarose, dessa forma, o diagnóstico por PCR é dito inconclusivo (Figura 5 A e D).

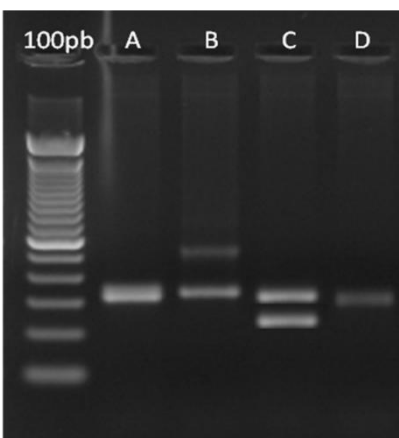


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos da PCR de mulheres triadas para SXF pelo laboratório de genética clínica UNB, 2010. Coluna 1: Marcador molecular de 100 pares de bases. Colunas A e D) mulheres inconclusivas. Coluna B) mulher heterozigota com um alelo normal e outro pré-mutado. Coluna C) Mulher heterozigota com alelos normais.

A PCR tem menor confiabilidade na detecção de alelos com pré-mutação e mutação completa. Quanto maior a expansão do gene, menor a amplificação por PCR na SXF, o que revela uma eficiência inversamente proporcional ao número de repetições CGG. Nos casos inconclusivos ou de portadores de grandes pré-mutações se faz necessária a utilização de outra técnica molecular complementar, como o *Southern Blotting* (SB), para a confirmação do diagnóstico.

A identificação da expansão CGG do gene *FMRI* com SB combina o uso das enzimas de restrição *EcoRI* e *EagI* (sensível à metilação), e a sonda StB12.3 que detecta a região de expansão CGG. O SB permite a identificação de alelos de diferentes tamanhos, incluindo os pré-mutados de expansões grandes, mutações completas, e avalia o padrão de metilação no gene *FMRI* (Rousseau *et al.*, 1991). O SB revela com precisão se o paciente é ou não afetado, independentemente do sexo. Embora permita diferenciar indivíduos normais, pré-mutados e com mutação completa além do estado da metilação dos alelos, a técnica de SB é incapaz de fornecer o número exato de repetições CGG, dificultando a diferenciação entre pacientes com pequenas pré-mutações e pacientes *Gray zone*. É uma técnica de custo elevado, laboriosa e que requer grande quantidade de DNA purificado, o que torna seu uso restrito e inviável numa rotina de triagem molecular (Oostra e Willemsen, 2001; Biancalana *et al.*, 2004).

Dessa forma, a implantação de um método para a triagem molecular para a SXF em laboratório de genética deve levar em conta a capacidade de se diagnosticar homens e mulheres afetados, de maneira simples e barata, permitindo a distinção de indivíduos normais, Gray-zone, pré-mutados e mutações completas.

## **OBJETIVO**

### ***Principal:***

Implantar uma metodologia de triagem molecular para a SXF em portadores de DM atendidos pelo Serviço de Genética Clínica do HUB/UnB.

### ***Específico:***

- Implantar um protocolo de PCR capaz de identificar portadores de mutação completa, e de pré-mutação no gene *FMRI*.

- Utilizar a eletroforese capilar para a identificação de mulheres com alelos heterozigotos para repetição CGG de tamanho semelhante, diminuindo a necessidade de realização de SB.

- Estimar a frequência de SXF nos indivíduos com DM atendidos pelo Serviço de Genética Clínica do HUB/UNB.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### ***Pacientes***

Este trabalho foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e obteve aprovação sob o registro de projeto: CEP-FM 021/2009.

Antes da inclusão do paciente no trabalho, foi fornecido amplo esclarecimento verbal aos pais ou responsáveis relatando os objetivos, riscos e benefícios que envolvem a pesquisa. Após a concordância com a participação do paciente sob sua responsabilidade no protocolo foi firmado, tanto pela responsável pela pesquisa como pelo responsável pelo paciente, o consentimento livre e esclarecido em duas vias ficando uma de posse do responsável pelo paciente.

Todos os resultados dos exames realizados foram fornecidos aos responsáveis pelos pacientes e uma cópia foi mantida nas respectivas fichas do prontuário. Os familiares dos pacientes que tiveram diagnóstico confirmado de SXF foram esclarecidos quanto ao diagnóstico e o risco de recorrência da síndrome na família. Esta ação permite a escolha da

melhor conduta a ser tomada que leva em consideração os prováveis riscos, nas suas aspirações e nos padrões éticos e religiosos. A esses pacientes foi oferecida a continuidade de atendimento no Serviço de Genética Clínica do HUB e em outros serviços do HUB quando necessário.

Foram investigados 128 pacientes com DM, sendo 98 homens e 30 mulheres, além de 29 familiares de afetados pela SXF que foram atendidos pela equipe de médicos geneticistas, no ambulatório do Serviço de Genética Clínica do HUB/UNB, no período de 2009-2011. Foram excluídos da amostra pacientes com DM com suspeita diagnóstica de outras síndromes conhecidas e portadores de cromossomopatias.

Os indivíduos indicados para a triagem eram separados entre propósito da triagem e familiares de SXF, totalizando 157 pacientes. Primeiramente os pacientes foram submetidos à principal triagem molecular para amplificação da região CGG do gene *FMR1* visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, no qual foi possível diferenciar indivíduos afetados pela SXF, mulheres heterozigotas e pré-mutações. Esta técnica foi utilizada tanto nos indivíduos propósitos como em familiares de SXF atendidos pelo serviço de genética clínica HUB/UNB.

Dos exames que resultaram positivo para SXF a triagem molecular era também estendida aos familiares maternos. Das famílias com diagnóstico de SXF foram construídos heredogramas utilizando o programa GenoPro®2011 versão 2.5.3.8.

### ***Coleta de material biológico***

Foram coletadas amostras de 2 a 4 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA como anticoagulante. O tubo com sangue recebia numeração individual e familiar do paciente e o registro continha informações referentes ao sexo, idade, procedência e indicação clínica para o paciente.

### ***Extração e quantificação de DNA***

O DNA foi extraído a partir de 1ml de sangue adicionado a solução de lise RBC (*Red blood cell lysis solution*), conforme protocolo do fabricante utilizando o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue™ (GE).

### ***PCR da região CGG em eletroforese em gel de agarose (PCR CGG-EA)***

Foi realizada PCR para amplificação da região CGG do gene *FMRI* nos indivíduos com DM. A reação de PCR foi adaptada de Khaniani *et al* (Mol Cytogenet.; 2008) utilizando *primers* *c* 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3' e *f* 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'. A amplificação foi realizada num volume total de 25µl contendo entre 50-100 ng de DNA genômico, 0.75 pmol de cada primer, DNTP 200µM, 10 µl de 5x Q-solution (Qiagen), 2.5 µl de 10x PCR Buffer e 1u de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação constituiu de 34 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Com o objetivo de amplificar grandes pré-mutações foram feitas modificações no protocolo original de Khaniani (2008). A temperatura de anelamento foi modificada de 70°C para 64°C e o volume de Q-solution (Qiagen) foi modificado de 8 µl para 10 µl, permitindo a amplificação das repetições maiores.

Para a padronização do protocolo, foram utilizadas amostras cedidas pelo laboratório de Genética Humana da Universidade de São Paulo com tamanhos diferentes e conhecidos de repetições CGG aferidas por genotipagem e seqüenciamento. Tais amostras possuíam os seguintes números de repetições: 22, 30, 32, 35, 43, 49, 78 e 112. A



padronização do protocolo foi realizada a fim de amplificar a amostra de 112 repetições. A Figura 6 mostra a amplificação das amostras controle.

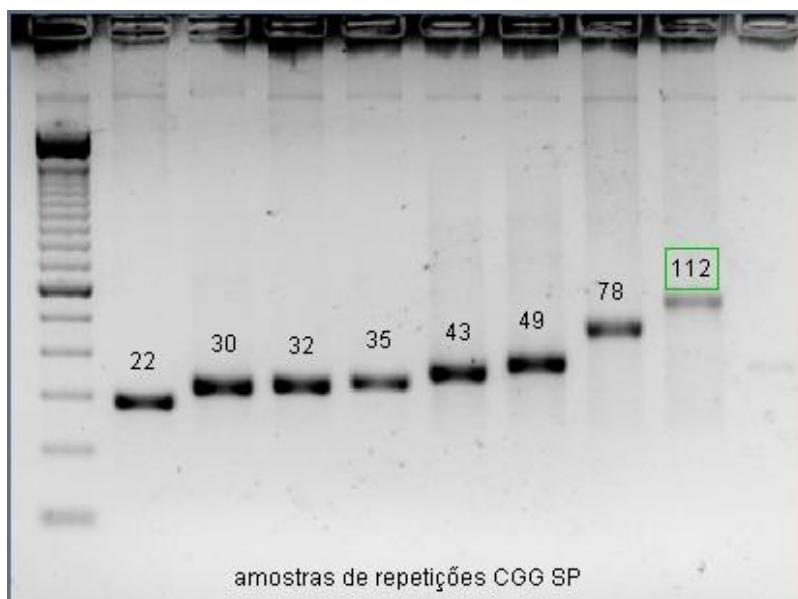


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando a amplificação das amostras com número conhecido de repetições CGG em PCR padronizado antes de iniciar a triagem. Os números na figura indicam o número de repetições CGG.

A amostra com 49 repetições foi utilizada como parâmetro em todas as PCR realizadas para estimar o tamanho dos fragmentos dos pacientes, uma vez que o tamanho da sua repetição é limiar para a pré-mutação. Indivíduos com bandas maiores que a amostra 49 foram considerados prováveis pré-mutados, dessa forma foi possível a identificação das amostras com prováveis pré-mutações ou que poderiam ser classificadas como *Gray-zone*.

### ***Eletroforese em gel de Agarose***

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose utilizando 8µl do material amplificado, juntamente com 2µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 31% e glicerol 30%). Desta mistura, 5µl foram depositados em cada poço do gel, e no primeiro poço foi colocada alíquota padrão de peso molecular de 100pb. O gel de Agarose foi preparado a 2% de concentração com 50 ml de tampão TBE 1x e 1g de agarose e 3µl de brometo de etídio 1mg/ml.

O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal contendo tampão TBE 1x para a corrida à 90V e 50A por aproximadamente 2 horas. Todos os géis foram fotografados em fotodocumentador e as fotos mantidas em ata para registro dos resultados das amostras.

### ***Interpretação dos resultados em agarose da PCR para a SXF.***

A PCR para a SXF utilizada fornece resultado de forma indireta, onde a ausência da amplificação indica a presença da mutação completa e impossibilita a visualização dos alelos de *FMRI*, ou seja, a ausência de banda é indicativa de SXF. Em amostras de

indivíduos normais do sexo masculino, a amplificação de seu único alelo gera um fragmento de aproximadamente 300pb e permite descartar a suspeita diagnóstica da SXF.

A definição de diagnóstico conclusivo e inconclusivo foi feita de forma diferenciada entre homens e mulheres na PCRs realizadas. Os resultados dos grupos propósitos e familiares foram analisados separadamente. Após a primeira triagem, os pacientes de cada grupo puderam ser classificados em normais, positivos para SXF, pré-mutados e inconclusivos, de acordo com o resultado obtido na PCR CGG-EA. O diagnóstico conclusivo foi determinado para as amostras que resultavam em normais, pré-mutadas e SXF positivas. O diagnóstico inconclusivo foi determinado quando não era possível diferenciar homozigotas de heterozigotas nas amostras de mulheres.

Para afastar falsos positivos, uma vez que nenhuma banda é visualizada nas amostras masculinas com mutação completa, a PCR das amostras positivas para SXF foi refeita adicionando um par de *primers* controle para amplificar o gene *MTHFR*, mapeado no cromossomo 1 para certificar que a amostra estava em perfeita condição de ser amplificada. O *primer* controle, inicialmente era utilizado em todos os pacientes, mas competia com os *primers* de interesse comprometendo a qualidade da amplificação. Dessa forma optamos por utilizá-lo apenas nos casos inferidos positivos no primeiro PCR. (Figura 7).

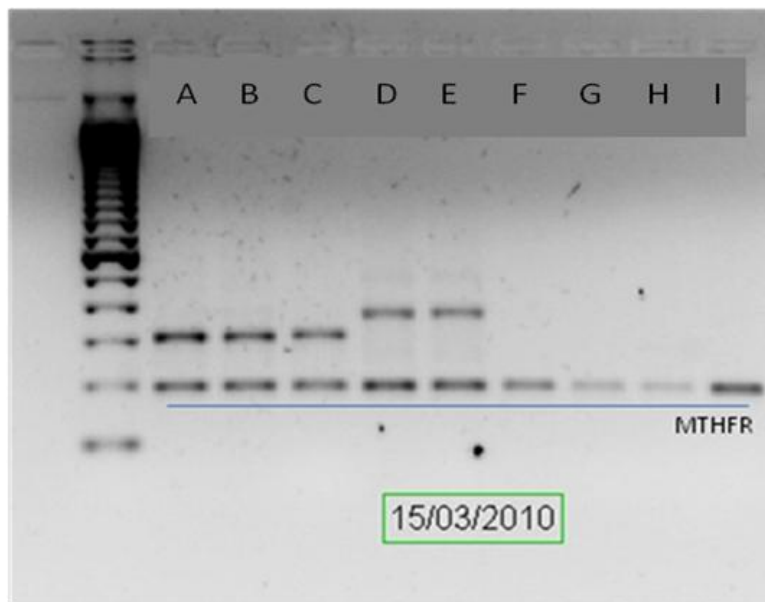


Figura 7: Amplificação do gene *MTHFR* por PCR CGG-EA para confirmação do diagnóstico em pacientes com suspeita de SXF. Amostras A, B, C, D e E, são de pacientes negativos para SXF. As amostras F, G, H e I são de pacientes positivos para SXF.

Em amostras de pacientes do sexo feminino, o diagnóstico por PCR é diferenciado, uma vez que elas podem apresentar tanto duas bandas como apenas uma banda em gel de agarose. A visualização de apenas uma banda é indicativo tanto de homozigose com dois alelos de mesmo tamanho, de heterozigose com alelos de tamanhos semelhantes, ou de heterozigose com um alelo normal e outro mutado ou com grande pré-mutação. Essas mulheres apresentarão apenas uma banda com tamanho aproximado de 300pb e são classificadas como inconclusivas.

Nas mulheres heterozigotas normais para alelos com mais de 27 bases de diferença é possível identificar duas bandas visualizadas no gel de agarose, resultando em diagnóstico negativo para SXF.

Em ambos os grupos, propósitos e familiares, primeiramente foi feita a PCR da região CGG do gene *FMRI* e quando resultado em inconclusivo, ou na presença de pré-mutação as amostras eram submetidas a um segundo PCR CGG visualizados em eletroforese capilar. Os pacientes que na primeira PCR utilizada apresentaram diagnóstico conclusivo (Normal e SXF positivo) não foram incluídos na segunda técnica. Apenas os pacientes em que os testes resultaram em inconclusivos e na suspeita de pré-mutação foram submetidos à PCR CGG e eletroforese capilar.

### ***PCR CGG em eletroforese capilar (PCR CGG-EC)***

Nas mulheres em que a PCR CGG-EA resultou inconclusiva e nos casos de indivíduos com pré-mutação foi realizada uma segunda PCR. Essa PCR foi realizada seguindo o mesmo protocolo para triagem molecular de SXF, com exceção do *primer* que era marcado com fluorocromo na extremidade 5' do primer *f*: 5'-/6FAM/ AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3', para permitir a leitura por eletroforese capilar. Os reagentes e ciclos da PCR CGG-EC seguiram conforme PCR CGG-EA.

As amostras amplificadas foram então submetidas à eletroforese capilar no sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) com a utilização do marcador de peso molecular GS500LIZ (Applied Biosystems), para estabelecimento do tamanho exato dos alelos e diferenciação, dessa forma, entre homozigose de heterozigose e a confirmação do número de cópias CGG nos indivíduos pré-mutados. Diferente da eletroforese convencional, a eletroforese capilar separa os fragmentos com maior resolução e precisão e permite determinar o tamanho exato dos fragmentos, conforme mostra a Figura 8 abaixo.

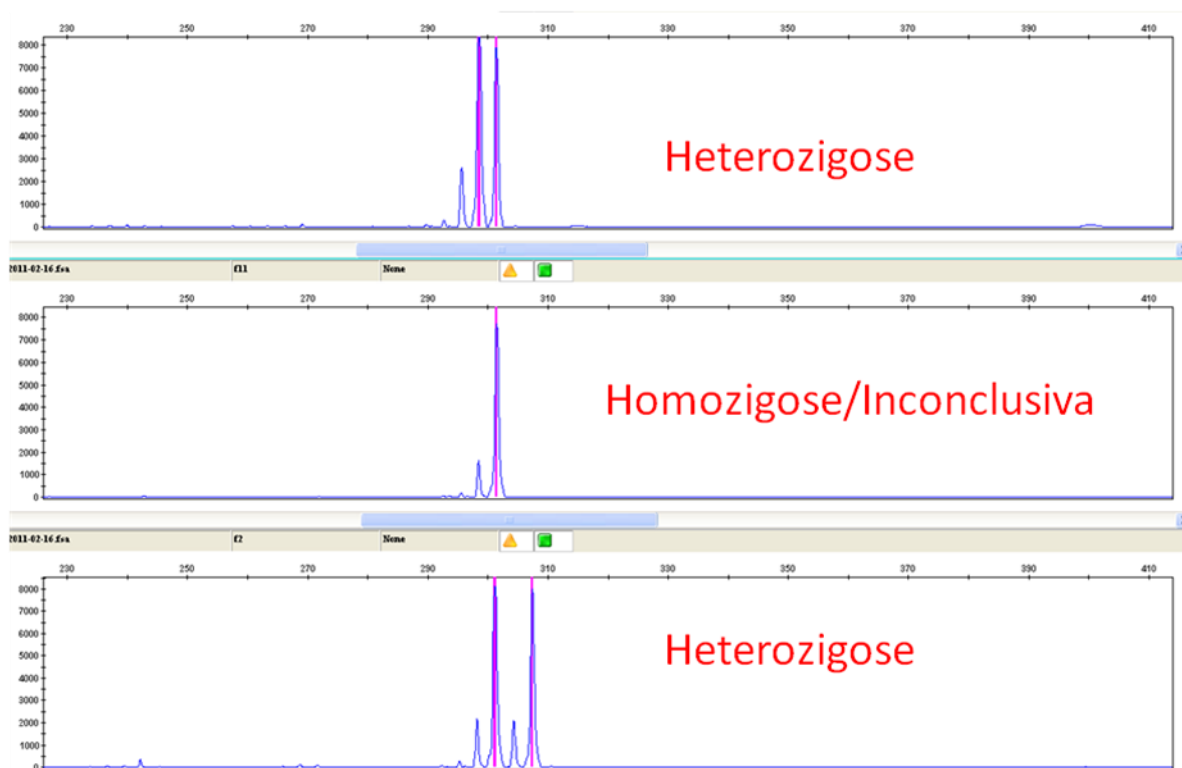


Figura 8: Resultado da eletroforese em capilar após amplificação da região CGG do gene FMR1. A e C: Padrão de picos registrado em paciente do sexo feminino em heterozigose, onde é possível visualizar dois picos, cada um representando um alelo. B: Padrão de pico indicando presença de apenas um alelo.

A análise dos resultados da eletroforese capilar foi feita utilizando o programa Genemapper (Applied Biosystems). Mulheres heterozigotas apresentam 2 picos, como mostra a Figura 8 A e C. Mulheres homozigotas ou portadoras de mutação completa ou grandes pré-mutações apresentam apenas 1 pico (B), permanecendo inconclusivas.

Para o cálculo do número de repetições CGG utilizamos como padrão as amostras com número conhecido de repetições CGG. A amostra com 49 repetições CGG, por exemplo, produzia um fragmento de 362 pb. Assim, o número de repetições das amostras foi calculado com base na seguinte fórmula:  $(\text{Tamanho do fragmento} - 215) / 3$ , onde 215 é o tamanho da região não repetitiva do gene *FMR1* amplificada.

### ***Análise de marcadores de microssatélite próximos ao gene FMR1***

No decorrer do trabalho, observamos que grande número de pacientes com diagnóstico confirmado de SXF positivos haviam sido encaminhados pela APAE de MG ao serviço de genética clínica do HUB/UNB. Levantamos a suspeita de existir uma Origem Parental naquela região de MG. Para verificarmos essa hipótese e inferirmos a ancestralidade da mutação no gene *FMR1* nos pacientes com SXF provindos daquela região, escolhemos os microssatélites DXS548 e FRAXAC1 (Figura 9) como marcadores de ancestralidade por possuírem a característica de segregarem ligados ao gene *FMR1* (Perprah *et al.*, 2010).



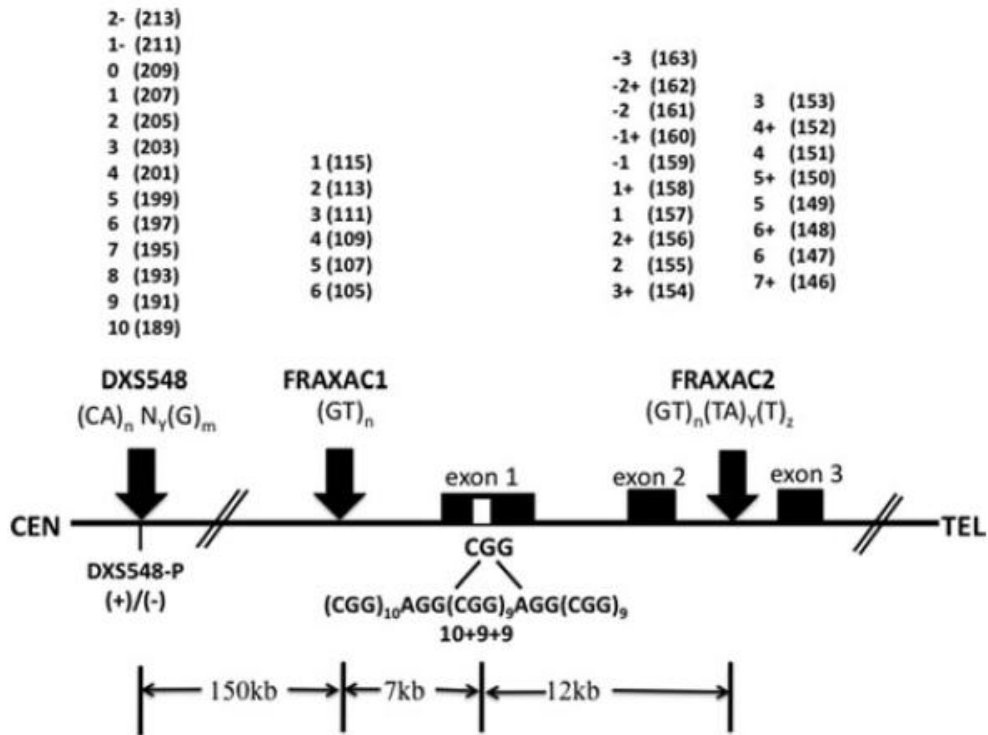


Figura 9: Localização dos STRs no sítio frágil FRAXA, adaptado de (Crawford et al., 2000c; Zhou et al., 2006). Todos os elementos do DNA estão dispostos do centrômero (CEN) ao telômero (TEL) com campos preenchidos representando os microssatélites e os éxons de *FMRI* representado por caixas. Para cada STR, é apontado com uma seta e seus respectivos alelos estão entre parênteses. Inserções/deleções polimórficas de DXS548 são designados com (+) para inserção e (-) para deleção, com o número de pares de bases indicado. O éxon 1 contém a repetição polimórfica CGG. Fonte: Perprah *et al.*, (2010).

As amostras selecionadas para testar os microssatélites foram de cinco indivíduos de diferentes famílias da mesma região de MG, com diagnóstico positivo para a mutação ou

pré-mutação, ou portadoras da mutação completa do gene. Foram incluídas ainda amostras controle de homens e mulheres normais não aparentados sendo dois provenientes daquela região e dois provenientes de outra localidade.

A formação histórica, territorial e populacional daquela região foi levantada e corrobora para a hipótese de Origem Parental na região. A história daquela região é fortemente ligada à ocupação do Centro-Oeste brasileiro. Quatro diferentes caminhos que conduziam aos sertões de Goiás se encontravam naquele território e dali seguia como uma só estrada. No local onde se reuniam, formou-se inicialmente um pequeno núcleo populacional, com algumas casas que forneciam abrigo e alimentação aos viajantes. A partir do momento em que foi dada a notícia do achado das riquezas auríferas na região, foram distribuídas diversas sesmarias na área, para povoamento. Assim, surgiram fazendas de criação de gado, cuja atividade abastecia as partes do território onde se explorava o ouro, onde a partir da chegada de um fazendeiro e ali se instalando com familiares, outros parentes e escravos. Outras famílias também se estabeleceram nas imediações, surgindo o povoado, que mais tarde daria origem à atual conformidade territorial e populacional daquela região.

Os alelos dos locos DXS548 e FRAXAC1, marcadores de ancestralidade, foram determinados por PCR, de acordo com protocolo de Mingroni-Netto *et al.*, (2002), e os *primers* utilizados para DXS548 e FRAXAC1 foram descritos por Riggins *et al.*,(1992) e

Richards *et al.*, (1991), respectivamente. Os *primers* F foram marcados com o fluorocromo FAM na extremidade 5' do primer.

Para a análise do loco DXS548, foram amplificados cerca de 200ng de DNA genômico num volume final de 15µl, contendo Tris-HCl 20mM (pH 8,4), KCL 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,7mM, DMSO 10%, DNTp 200µM cada, 0,75u de taq polimerase e 35pmoles de cada *primer*. Os *primers* utilizados foram F: 5'-/6FAM/GTA CAT TAG AGT CAC CTG TGG-3' e R: 5'-AGA GCT TCA CTA TGG AAT GGA ATC-3'. A reação de amplificação consistiu da desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 29 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 59°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a análise do loco FRAXAC1 foram amplificados cerca de 200ng de DNA genômico num volume final de 15µl, contendo Tris-HCl 20mM (pH 8,4), KCL 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, DMSO 10%, DNTp 200µM cada, 0,75u de taq polimerase e 35pmoles de cada *primer*. Os *primers* utilizados foram F: 5'-/6FAM/GAT CTA ATC AAC ATC TAT AGA-3' e R: 5'-GAT GAG AGT CAC TTG AAG CTG G-3'. A reação de amplificação por PCR consistiu da desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 57°C por 90 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos, seguida por mais 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento

a 55° por 90 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados de DXS548 e FRAXAC1 foram submetidos à eletroforese capilar para a determinação dos alelos, como descrito anteriormente.

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

### ***Triagem molecular para SXF em pacientes com DM – Propósitos***

Para a triagem molecular da SXF, foram encaminhados pelo Serviço de Genética Clínica do HUB/UnB 128 pacientes com DM (propósitos) indicativos de SXF. Dentre estes, 98 homens e 30 mulheres foram testados por PCR CGG-EA (Tabela 3). Os pacientes masculinos representaram 76,6% das amostras, enquanto que pacientes femininos corresponderam a 23,4% das amostras.

Tabela 3: Distribuição da frequência do total de amostras de propósitos quando ao sexo.

Sexo	Frequência	
	Absoluta	Relativa
Masculino	98	76,6%
Feminino	30	23,4%
Total	128	100%

### ***PCR CGG-EA do gene FMRI – Propósitos***

Os 128 pacientes propósitos foram testados pela PCR CGG-EA da região CGG do gene *FMRI* e foi possível determinar o diagnóstico conclusivo em 85,2% dos pacientes. Apenas 14,8% dos pacientes com DM resultou em inconclusivo (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência obtida quanto à conclusividade do diagnóstico por PCR CGG-EA.

Diagnóstico	Frequência
Conclusivo	109 (85,2%)
Inconclusivo	19 (14,8%)*
Total	128 (100%)

\*O diagnóstico inconclusivo é dado somente para as amostras de mulheres.

Dos homens testados, 89.79% apresentaram padrão de banda normal para a repetição CGG. A frequência de diagnóstico positivo para SXF em homens com DM atendidos pelo serviço de genética clínica HUB/UnB foi de 8.16%, enquanto que 2.04% foram de pré-mutados (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA em amostras masculinas.

Classificação	Homens
Normal	88 (89.79%)
SXF	8 (8,16%)
Pré-mutação	2 (2.04%)
Total	98 (100%)

A metodologia empregada para a triagem molecular da SXF em pacientes com DM utilizando de PCR CGG-EA foi capaz de detectar todos os pacientes positivos para SXF, alelos normais e pré-mutações nos pacientes testados.

O diagnóstico por análise da PCR CGG-EA foi suficiente para determinar o diagnóstico de meninos. O resultado conclusivo foi determinado em mais de 89% da amostra masculina com DM (Tabela 5). A incidência de SXF em meninos com DM foi de 8,16%, valor acima do esperado de 3 e 6% (Mingroni-Netto, 1996; Jorde *et al.*, 2004). Christofolini *et al* (2006) triando meninos com DM encontraram frequência maior, 13,7% que pode ser explicado pela triagem clínica elaborada que obedeceu rigorosamente *checklist* proposto para SXF na população brasileira. Embora a frequência de achados no presente trabalho tenha sido 5% menor, os indivíduos triados não foram rigorosamente apreciados como clinicamente indicativo de SXF, mas sim de DM de origem desconhecida o que nos leva a entender que o achado de 8,16% de SXF positivos é um índice elevado

para a quantidade de indivíduos analisados. Entretanto, ainda a baixo quando comparado com Turner *et al.*,(1996) que encontraram 14% de SXF em todos os retardos mentais idiopáticos analisados , no sexo masculino, e aparentemente incide de forma similar em todos os grupos étnicos.

Em análises associativas com *checklists* elaborados para pacientes do sexo masculino, Giangreco *et al* (1996) puderam eliminar da triagem molecular mais de 60% da amostra, sem a perda de nenhum caso positivo, enquanto que a triagem elaborada por Hagerman *et al* (1991) permite a eliminação segura de aproximadamente 45% dos pacientes com suspeita de SXF .

Nas mulheres testadas, conforme demonstrado na Tabela 6, foi possível determinar heterozigose em 36.66% e o diagnóstico inconclusivo foi indicado em 63.34%. Nenhuma mulher pré-mutada foi encontrada entre os propósitos.

Tabela 6: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA do gene FMR1 em amostras de pacientes do sexo feminino.

Classificação	Mulheres
Normal	11(36,66%)
Inconclusiva	19(63,34%)
Total	30(100%)



Em 36,66% das amostras femininas analisadas por PCR CGG em agarose foi possível definir heterozigose com dois alelos de tamanhos normais (Tabela 6). Na maioria dos laboratórios em que é feito o teste para SXF, as triagens são realizadas exclusivamente em homens, devido à dificuldade em se identificarem mulheres heterozigotas (Filipovic-Sadic, 2010).

Com resultados classificados como inconclusivos, foram identificadas aproximadamente 63% das amostras de mulheres analisadas (Tabela 6), o que ainda está acima do esperado. De acordo com Saluto *et al* (2005) mais de 20% das amostras de mulheres analisadas, apresentaram diagnóstico molecular inconclusivo/homozigose na PCR e indicadas para SB. A análise de amostras de mulheres com mutação completa e com pré-mutação é dificultada pela preferência da reação na amplificação do alelo normal (Saluto *et al*, 2005; Filipovic-Sadic *et al*, 2010).

Do total de amostras de propósitos analisadas pela PCR CGG-EA da região CGG do gene *FMRI*, 77,34% foram diagnosticadas como normais para a mutação no gene e 6,25% da amostra foi positiva para SXF. Da amostra total, 14,84% resultaram em inconclusiva e 1,56% apresentaram pré-mutação em gel de agarose (Tabela 7).

Tabela 7: Total de pacientes com DM (propósitos) testados por PCR CGG-EA da repetição CGG do gene *FMRI*.

Classificação	Total
Normais	99(77,34%)
SXF positivo	8(6,25%)
Pré-mutação	2(1,56%)
Inconclusivo	19(14,84)
Total	128(100%)

### ***PCR CGG-EC em propósitos***

Foram testadas para PCR CGG em eletroforese capilar, 19 amostras de mulheres propósitos que resultaram em inconclusivas pela PCR CGG-EA na primeira triagem. Através da eletroforese capilar foi possível determinar o diagnóstico conclusivo (normal) em 73,68% dessas mulheres, porém em 26,32% o diagnóstico permaneceu inconclusivo (Tabela 8).

Tabela 8: PCR CGG-EC de pacientes (propósitos) inconclusivos em PCR CGG-EA.

Resultado	Mulher
Normal	14(73,68%)
Inconclusivo	5(26,32%)
Total	19

No presente trabalho, a associação das duas técnicas empregadas, foi possível detectar heterozigose em 25, das 30 mulheres com DM triadas para SXF, reduzindo em 83% a necessidade de testar por SB. Filipovic-Sadic *et al.*, (2010), em estudo comparativo entre os técnicas de triagens para SXF de eletroforese capilar e de SB, evidenciaram que a eletroforese capilar é capaz de reduzir em até 99% a indicação para SB.

A partir da análise em eletroforese capilar das amostras inconclusivas foi possível determinar o número de repetições CGG contidas em cada alelo. Das 19 mulheres analisadas, que resultaram em inconclusivas na PCR CGG-EC, o alelo 27 (um caso), 28 (dois casos), 29 (um caso) e 30 repetições CGG (um caso) foram os mais frequentemente associados à homozigose. Os alelos 28 e 29 foram encontrados com maior frequência em amostras resultadas normais o que difere de estudos em populações caucasianas nas quais os alelos 29 e 30 foram os mais comuns (Malmgren *et al*, 1994; Haataja *et al*, 1994; Kunst *et al*, 1996; Chiurazzi *et al*, 1996a). Em outros estudos populacionais realizados por Peprah *et al* (2010) os alelos encontrados com maior frequência em população afro americana de *Ghanaian* foram de 29 e 30 repetições CGG.

No presente trabalho os propósitos identificados como pré-mutados pela PCR CGG-EA, ambos do sexo masculino, foram submetidos a PCR CGG-EC para a determinação do número de repetições CGG. A técnica revelou que cada alelo continha repetições de 362 e 374 bases cada uma, equivalendo a 49 e 53 repetições CGG respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Alelo e número de repetições CGG em Homens propósitos testados em eletroforese capilar.

Alelo	Repetições CGG	Classificação
362	49	Gray-zone
374	53	Gray-zone

Dois meninos propósitos com DM testados por eletroforese capilar com suspeita de serem pré-mutações, ambos foram classificados como Gray-zones, com 49 e 53 repetições CGG respectivamente. O alelo intermediário, ou Gray-zone encontrado tanto em paciente masculino como em feminino, não é indicativo de SXF. Apesar dos meninos que apresentaram *Gray-zone* terem DM, é sabido que este alelo não é associado à DM, atraso no desenvolvimento ou dificuldade de aprendizado mas pode ser instável em gerações futuras. Outras abordagens devem ser feitas nestes pacientes para determinar a etiologia do DM. Macpherson & Sawyer, (2005) recomendam que tais pacientes sejam acompanhados pelo serviço de genética para aconselhamento e investigação de familiares para a determinação da instabilidade da repetição CGG em gerações futuras.

### ***Triagem molecular para SXF em familiares de pacientes com SXF***

O presente trabalho testou 29 familiares de SXF em PCR para amplificar a região CGG do gene *FMR1*. A amostragem dos familiares compreendeu material genômico de 8 homens e 21 mulheres e as frequências podem ser observada na Tabela 10 seguinte.

Tabela 10: Distribuição da frequência do total de amostras de familiares quando ao sexo.

Sexo	Frequência	
	Absoluta	Relativa
Masculino	8	27,58%
Feminino	21	72,42%
Total	29	100%

### ***PCR CGG-EA do gene FMR1 em Familiares***

O diagnóstico conclusivo (normal, SXF positivo e pré-mutação) foi estabelecido em 48,28% das amostras de familiares de SXF, visualizadas em gel de agarose (Tabela 11), enquanto que 51,72% das amostras resultaram em inconclusivas.

Tabela 11: Frequência obtida quanto à conclusividade do diagnóstico por PCR CGG-EA.

Diagnóstico	Total
Conclusivo	14 (48,28%)
Inconclusivo	15 (51,72%)*
Total	29 (100%)

\*O diagnóstico inconclusivo é dado somente às amostras de mulheres.

Por possuírem parentesco com afetados para SXF, é esperado que nessa amostragem seja encontrada maior frequência de pessoas positivas para SXF bem como de mulheres com resultados inconclusivos. É possível que as mulheres inconclusivas de familiares de afetados pela SXF apresentem maior frequência de mutações completas quando analisadas por SB, visto que muitas dessas mulheres também possuem DM, ou relato de dificuldade no aprendizado escolar.

Dos 8 familiares masculinos analisados por PCR CGG através de eletroforese em agarose, 1 resultou em positivo para a SXF, enquanto que 5 foram diagnosticados como normais para a mutação. Dos homens analisados, 62.5% foram diagnosticados como normais para a mutação e dois apresentaram pré-mutações.

Tabela 12: Classificação quanto ao resultado da PCR CGG-EA em amostras de familiares do sexo masculino.

Classificação	Homens
Normais	5(62,5%)
SXF positivo	1 (12,05%)
Pré-mutação	2 (25%)
Total	8 (100%)

De acordo com Rosseau *et al*, (1994), em indivíduos de famílias de SXF, pré-mutações são observadas em maior frequência que mutações completas, o que concorda com o que foi observado no presente trabalho. A amostra de um único paciente masculino resultou em positivo para SXF, o que corresponde a 12,05% dos familiares homens, enquanto que 25% deles apresentaram pré-mutação (Tabela 12). A mesma regra se aplica nas observações referentes às amostras femininas (Tabela 13).

Como pode ser observado na Tabela 13, das mulheres analisadas, 14,28% apresentaram resultados normais e em 14,28% das amostras foram observadas a pré-mutação, enquanto que 71,44% resultaram em inconclusivos.

Tabela 13: Classificação de Familiares do sexo feminino de SXF identificados por PCR CGG-EA.

Classificação	Mulheres
Normais	3(14,28%)
Pré-mutação	3(14,28%)
Inconclusivos	15(71,44%)
Total	21(100%)

Analisando o total de amostras de familiares testados por PCR da região CGG do gene *FMRI*, o diagnóstico normal pode ser observado em 27,58% das amostras. Um indivíduo resultou em positivo para SXF, e corresponde a 3,45% das amostras. A pré-mutação foi observada em 17,24% das amostras, enquanto que 51,72% das amostras resultaram em inconclusivas (Tabela 14).

Tabela 14: Total de familiares de pacientes com SXF testados pela PCR CGG-EA.

Classificação	Total
Normais	8 (27,58%)
SXF positivo	1 (3,45%)
Pré-mutação	5 (17,24%)
Inconclusivos	15(51,72%)
Total	29 (100%)

### ***PCR CGG-EC em Familiares***

Das 15 amostras inconclusivas de familiares de SXF analisadas por eletroforese capilar (Tabela 15), 66,66% apresentaram como resultado heterozigose com alelos normais, 26,66% apresentaram um único alelo normal e foram classificadas como inconclusivas. Uma única amostra apresentou heterozigose sendo um alelo normal e outro *Gray-zone*, o que corresponde a 6,68% das amostras.



Tabela 15: Amostras inconclusivas de Familiares testados pela PCR CGG-EC.

Resultado	Mulher
Normal	10 (66,66%)
Gray-zone	1 (6,68%)
Inconclusivo	4 (26,66%)
Total	15

Das 21 amostras de familiares do sexo feminino testadas, 15 foram classificadas como inconclusivas, enquanto que apenas três apresentaram heterozigose com alelos de tamanhos normais e três apresentaram como resultado a pré-mutação. Das inconclusivas, 10 apresentaram alelos de tamanhos normais em eletroforese capilar enquanto que uma mulher foi classificada como Gray-zone e 4 permaneceram inconclusivas.

Com a utilização da eletroforese capilar, foi possível determinar o número de repetições CGG presentes em cada alelo dos familiares de pacientes SXF testados, conforme demonstra a Tabela 16.

Todas as mulheres homozigotas em PCR CGG-EC apresentaram em comum o mesmo alelo de 29 repetições CGG. A amostra em Gray-zone também apresentou a repetição 29 entre seus alelos. É provável que estas mulheres inconclusivas possuam grandes chances de portarem a mutação completa para FMR1 ou até mesmo pré-mutação, principalmente por apresentarem histórico de SXF na família e dificuldade de aprendizado,

ou DM, o que de acordo com Hantash *et al.*, (2011), também pode influenciar no aumento da frequência de pré-mutados nessas amostras.

Tabela 16: Alelos encontrados por eletroforese capilar das amostras inconclusivas de familiares de SXF.

N. casos	Alelo 1/CGG	Alelo 2/CGG
1	296/27	305/30
2	299/28	302/29
4	302/29	*
3	302/29	308/31
1	302/29	323/36
1	302/29	344/43
1	302/29	299/28
1	302/29	362/49
1	320/35	317/34

\*Homozigose/inconclusiva. Em vermelho, 4 pacientes que resultaram em inconclusivas com alelo em comum de 29 repetições CGG. Em azul, alelos da paciente que apresentou *Gray-zone* com 49 repetições CGG.

Os pacientes que na PCR CGG-EA da repetição CGG do gene FMR1 eram indicativos de pré-mutação foram testados em eletroforese capilar para determinar o número de repetições CGG contidas no alelo e, dessa forma, classifica-los melhor quanto ao seu polimorfismo (Tabela 17).

Tabela 17: Alelo e número de repetições CGG em familiares pré-mutados testados em eletroforese capilar.

Alelos ub	Repetição CGG	Classificação
283	23*	Normal
302	29*	normal
362	49*	Gray-zone
504	97**	Pré-mutação
507	98**	Pré-mutação

\*Amostra de mulher homozigota/inconclusiva. \*\*Amostra de homem.

Cinco familiares com suspeita de pré-mutação em agarose, foram testados por eletroforese capilar, sendo 2 homens e 3 mulheres. Nos dois homens foram detectados alelos pré-mutados de 97 e 98 repetições CGG respectivamente. Aproximadamente 20% dos pacientes com a mutação completa também são mosaicos para a pré-mutação, que pode ser pouco menor que a mutação completa (Macpherson & Sawyer, 2005), o que fortalece a indicação de que estes pacientes possam ser portadores da mutação completa em um dos alelos.

No total de mulheres inconclusivas analisadas por eletroforese capilar, foi possível identificar os alelos encontrados com maior frequência, como mostra a Tabela 18.

Tabela 18: Alelos encontrados nas amostras das mulheres inconclusivas de propósitos e familiares de SXF em eletroforese capilar.

N. casos	Alelo 1/CGG	Alelo 2/CGG
1	296/27	305/30
1	296/27	302/29
1	296/27	*
1	296/27	281/22
2	299/28	302/29
1	299/28	289/25
3	299/28	*
1	299/28	308/31
1	299/28	296/27
5	302/29	*
6	302/29	308/31
1	302/29	323/36
1	302/29	344/43
1	302/29	362/49
1	302/29	275/20
1	302/29	305/30
1	302/29	293/26
1	302/29	305/30
1	305/30	299/28
1	305/30	*
1	320/35	317/34

\* Mulheres inconclusivas tanto na PCR CGG-EA como na PCR CGG-EC.

Com a eletroforese capilar, foi possível determinar o número exato de repetições CGGs e a partir deste dado determinar os alelos de cada indivíduo quanto ao número de bases apresentadas e classifica-los em alelo normal, *Gray-zone* e pré-mutado. As repetições mais frequentemente observadas foram 31, 29 e 28 repetições CGG, sendo que em homozigose, a mais freqüente foi a repetição 29 em 5 indivíduos testados. Mingroni-netto *et al*, (2005), em estudo da freqüência de alelos CGG em população brasileira, encontraram

30 repetições CGG como a mais freqüente e Crawford 2000a, em estudo com caucasianos, encontrou o alelo 29 e 30 como os mais freqüentes.

### *Avaliação da PCR CGG-EA*

Da utilização da PCR para amplificação da região CGG e visualização de seu produto em gel de agarose, foi possível a identificação de pré-mutações maiores que 98 repetições CGG (Figura 10) e ainda, diferenciar mulheres heterozigotas das homozigotas quanto a presença de um ou dois alelos.

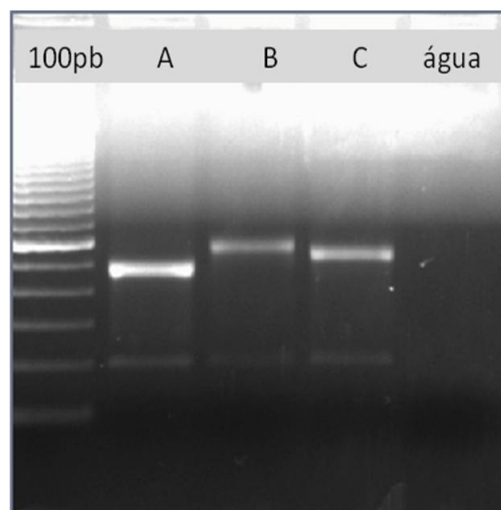


Figura 10: PCR CGG-EA. A) Amostra com 78 repetições CGG de SP. B) Amostra com 112 repetições de SP. C) Paciente masculino triado com 98 repetições CGG.

A maior dificuldade encontrada em identificar a heterozigose nas mulheres testadas e visualizadas em gel de agarose foi perceber a diferença de tamanho entre os dois alelos.

Enquanto que em algumas amostras era perfeitamente possível determinar heterozigose, com alelos distinguíveis entre si (Figura 11, F), em outras amostras se via uma única banda (Figura 11, A, C, G e H), ou uma banda mais grossa (Figura 11, B, D e E) o que tornava o diagnóstico inconclusivo.

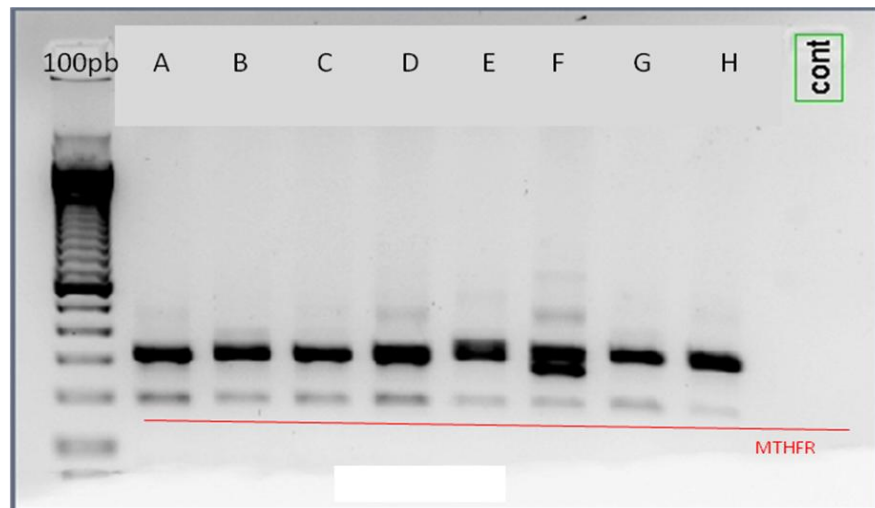


Figura 11: Amplificação da repetição CGG em mulheres. F) Mulher heterozigota. Restante das amostras A, B, C, D, E, G e H são de inconclusivas.

Testes moleculares para a detecção da SXF são técnicas amplamente utilizadas em diagnóstico moleculares, mas também são conhecidos pelos laboratórios de triagem, como testes genéticos mais desafiantes, devido à dificuldade de amplificar regiões longas ricas em repetições CGG (Hawkins *et al.*, 2011). A determinação exata do tamanho do alelo pode variar entre metodologias e laboratórios. Na tentativa de padronizar o tamanho de

alelo obtido e sua repetição correspondente, Hawkins *et al* 2011 prepararam e validaram o primeiro painel de referência genética para SXF aprovada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) com a colaboração de 21 laboratórios em 17 países participantes. Os autores conseguiram encontrar 5 amostras de DNA genômico para referencia-las como padrão com repetições estáveis e conhecidas que podem tanto serem utilizadas em PCR normal quanto em eletroforese capilar . Essas amostras de DNA foram aprovadas pela *European Society of Human Genetics* e pelo *International Standard by the Expert Committe on Biological Standadization* da OMS.

A análise do gene *FMRI* é feita, geralmente, utilizando técnicas de PCR e SB. O teste SB é utilizado para identificar repetições CGG muito grandes para serem amplificadas por PCR. Infelizmente a técnica de SB é de custo elevado e exige disponibilidade de tempo laboratorial intenso, além de requerer grandes quantias de DNA genômico, tornando o método desvantajoso (Filipovic-Sadic, 2010). A metodologia empregada neste trabalho envolvendo duas técnicas de análise da PCR se mostrou eficaz na identificação de indivíduos negativos, positivos SXF, portadores da pré-mutação, bem como na identificação de mulheres heterozigotas, diminuindo, dessa forma, a necessidade de indicação para SB.



## ***Avaliação da PCR CGG-EC***

Utilizando eletroforese capilar, foi possível diferenciar mulheres homozigotas das heterozigotas e determinar o número exato de repetições CGG nas amostras de pré-mutados. A determinação de inconclusividade se deu quando foi visualizado apenas um alelo, ou seja, na suspeita de homozigose.

A eletroforese capilar é uma técnica precisa e eficiente, e no presente trabalho tornou possível a observação de até uma repetição CGG de diferença entre os tamanhos dos alelos de mulheres heterozigotas. A maior diferença observada entre alelos de heterozigotas foi de 35 repetições CGG.

Foi possível determinar o número de repetições CGG em cada alelo dos pacientes, medidos em eletroforese capilar de acordo com o número de bases que cada alelo apresentou. A partir deste dado, foi possível classificar os alelos em normal, *Gray-zone* e pré-mutado. Na tabela 19, pode se observar o total de alelos encontrados e sua classificação quanto ao número de repetições CGG.

Tabela 19: Alelos, em unidades de base (ub), encontrados com correspondência e classificação com o número de repetições CGG.

Alelo ub	Repetições CGG	Classificação
269	18	Normal
272	19	Normal
275	20	Normal
281	22	Normal
283	23	Normal
289	25	Normal
293	26	Normal
296	27	Normal
299	28	Normal
302	29	Normal
305	30	Normal
308	31	Normal
311	32	Normal
314	33	Normal
317	34	Normal
320	35	Normal
323	36	Normal
326	37	Normal
329	38	Normal
332	39	Normal
335	40	Normal
338	41	Normal
341	42	Normal
344	43	Normal
347	44	Normal
350	45	Gray-zone
353	46	Gray-zone
356	47	Gray-zone
359	48	Gray-zone
362	49	Gray-zone
374	53	Gray-zone
504	97	Pré-mutação
507	98	Pré-mutação

## ***Heredogramas***

Das famílias em que os testes no propósito resultaram em positivo para SXF, foram construídos heredogramas com base nas informações contidas nos respectivos registros familiares (RF) preenchidos pela equipe de médicos geneticistas do serviço de genética clínica HUB/UnB durante a consulta clínica.

As informações contidas nos RFs eram fornecidas geralmente pela mãe do paciente ou por parente responsável que o acompanhava. Para a construção do heredograma, foram usadas as informações que indicassem presença ou ausência de DM em cada indivíduo da família com base nas informações fornecidas pelo familiar.

As amostras de pacientes com DM e de familiares de SXF triadas separadamente fornecem informações individualizadas que nos permitem avaliar a qualidade das técnicas utilizadas, o polimorfismo que o indivíduo apresenta em seu alelo assim como a mutação no gene *FMRI* e a possibilidade de um diagnóstico que identifique a etiologia do DM no paciente. Quando o resultado do teste em determinado paciente é analisado inserido em sua conjuntura familiar, a triagem vai além do diagnóstico e torna sua importância preditiva quanto à recorrência da SXF e das síndromes associadas à SXF na família do afetado.

Dos 8 pacientes propósitos resultados positivos para SXF, dois eram provenientes da região região de MG estudada, de duas famílias distintas, Família E e Família H, respectivamente. Em duas famílias de SXF de Unaí (I e J) foi possível analisar amostras dos familiares e construir os heredogramas.

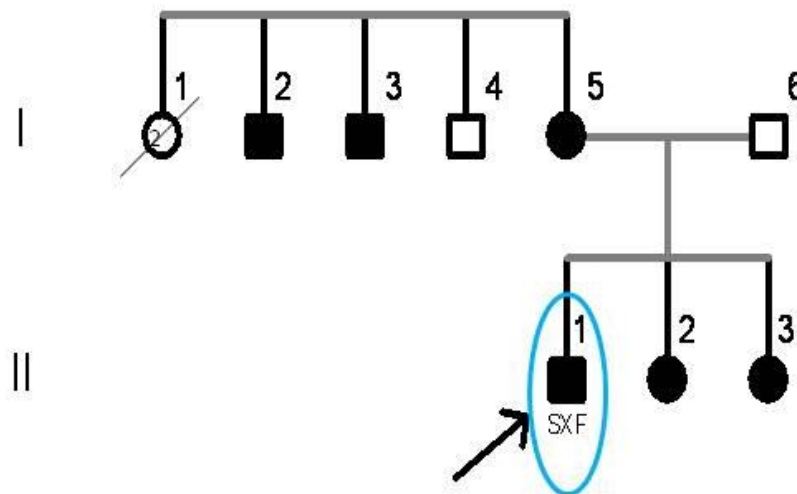
Os heredogramas foram construídos reunindo as informações referentes ao resultado da triagem molecular das amostras acessadas e das informações contidas nos RFs. Todas as famílias dos propósitos, SXF positivos, possuem histórico familiar de DM em mais de um membro da família e/ou geração. Não foi possível ter acesso a todos os membros das famílias.

**Família A:**

Amostras testadas: propósito II1 (circulada em azul).

O propósito foi testado e resultou em positivo para SXF. O histórico familiar é sugestivo de SXF devido à presença de DM na irmandade materna nos indivíduos I2, I3 e a mãe I5.

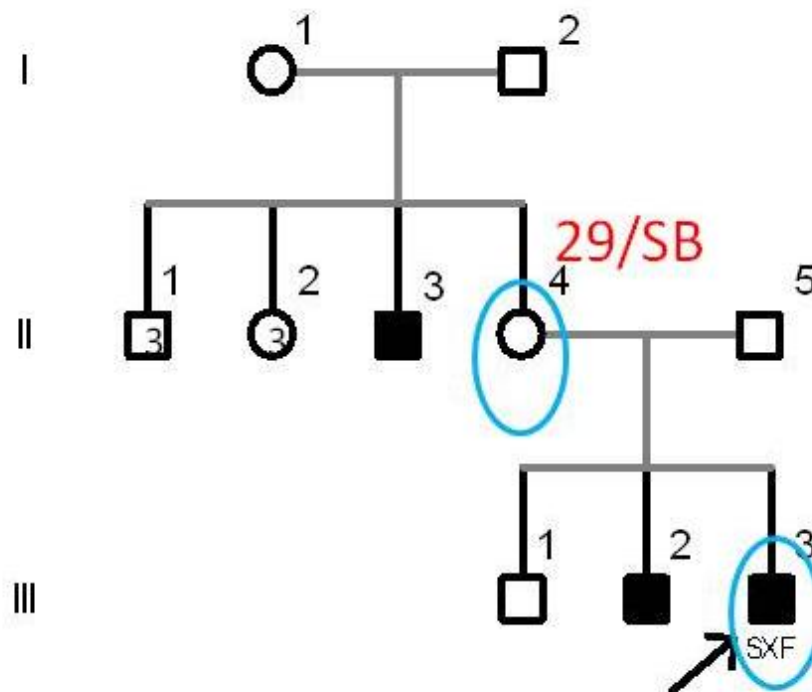
As irmãs do propósito, II2 e II3 também têm DM, o que sugere que a mãe I5 tenha a mutação completa para a repetição CGG no gene *FMRI*. Apenas a amostra do propósito foi testada, não foi possível ter acesso aos demais familiares.



**Família B:**

Amostras testadas: propósito III3 e mãe do propósito, II4.

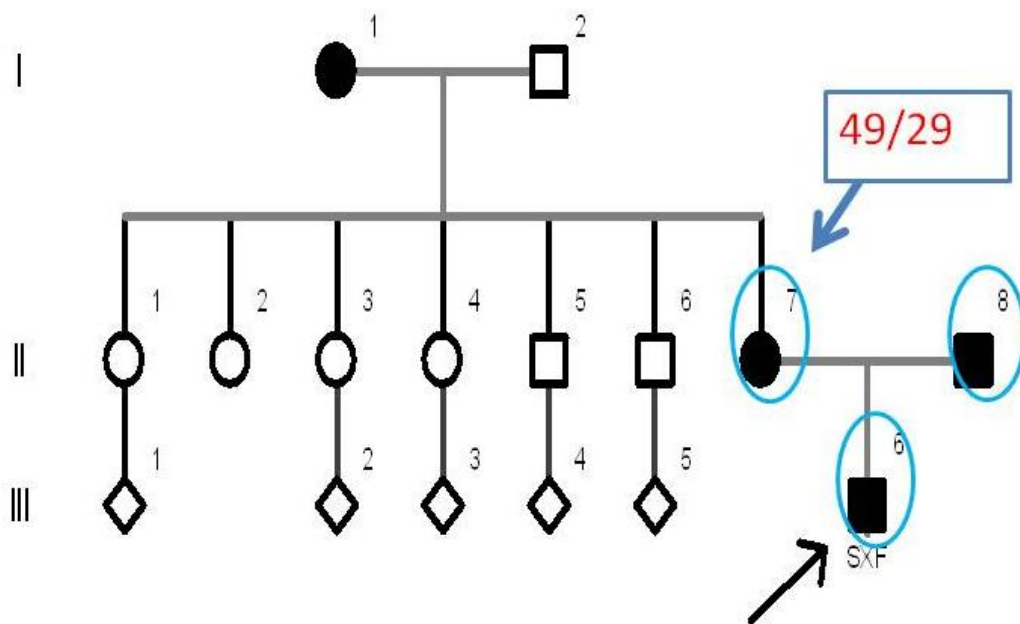
Propósito testado e resultado positivo para SXF. Mãe do propósito inconclusiva apresentando único alelo de 29 repetições CGG. Mãe do propósito é indicação para SB.



**Família C:**

Amostras testadas: Propósito e pais do propósito.

O propósito III6 foi positivo para SXF. O pai do propósito II8 com DM foi negativo para SXF. A mãe II7 do propósito tem DM e demonstrou ser *Gray-zone* em eletroforese capilar, com alelos 49/29 repetições CGG. A mãe do propósito apresentou possuir DM. Não tivemos acesso aos demais familiares.



Alelos com tamanhos aproximados entre 46-58 repetições CGG pode ser um desafio para o diagnóstico molecular da SXF em termos de interpretação, uma vez que eles representam o limiar entre alelo normal e pré-mutação. Esses alelos são transmitidos

estáveis, mas são passíveis de ocorrer transmissão instável do alelo com o aumento do tamanho de repetições (Murray *et al*, 1991). Embora a mãe do paciente tenha apresentado DM, estudos em amostras com alelos em *Gray-zones*, não apontam relações desse alelo com atraso no desenvolvimento ou déficit de aprendizado (Dombrowski *et al*, 2002). Adicionalmente, é conhecido que nenhum indivíduo com alelo intermediário mostrou fenótipo com envolvimento clínico com FXTAS ou FOP ou atraso no desenvolvimento (Macpherson & Sawyer, 2005). Tão pouco foi observado na literatura a expansão de *Gray-zone* para a mutação completa numa única geração sem antes ter se expandido para uma pré-mutação (Dombrowski, 2002).

A paciente II7 tem 49 repetições CGG e seu único filho III6, é positivo para SXF. Testes no pai II8 não confirmaram mutação indicativa para SXF e a avó materna II foi relatada como portadora de DM.

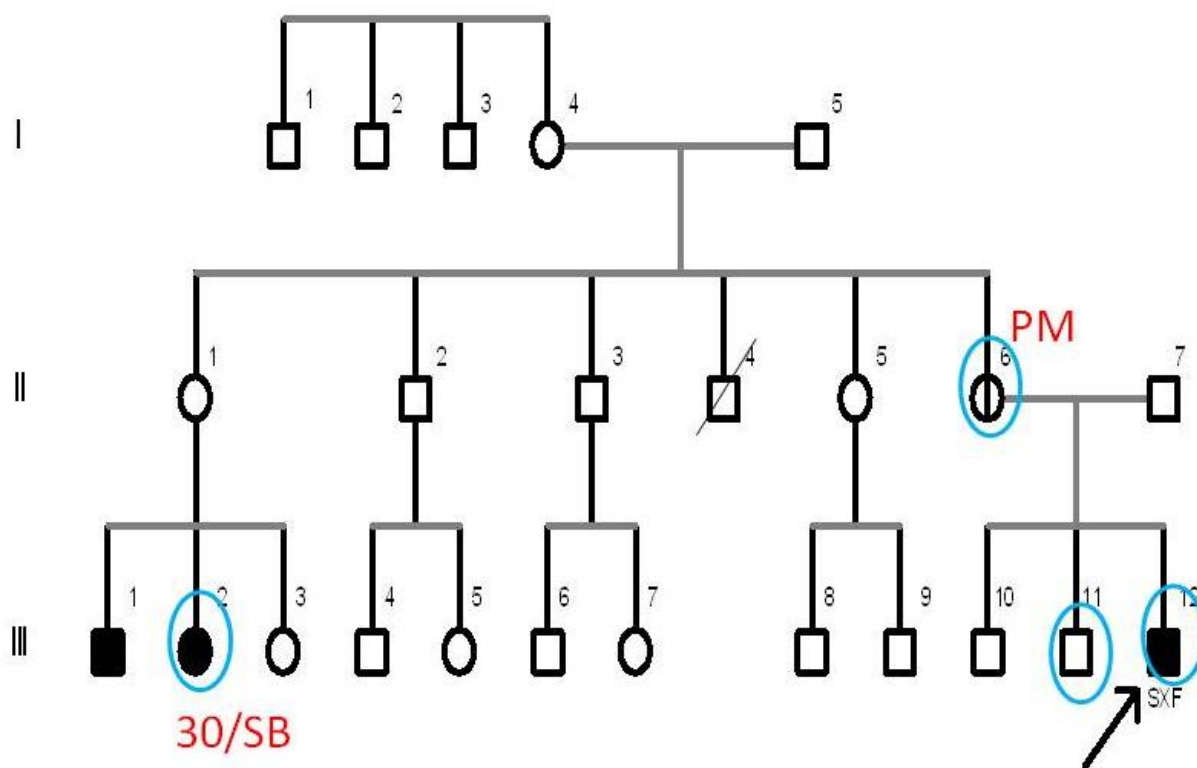
A mãe do propósito indica a possibilidade de ser mosaico para o alelo mutado, uma vez que também possui DM. Não podemos inferir com certeza, sem antes estender o teste para outros familiares, se houve ou não a expansão do alelo *Gray-zone* para uma mutação completa em apenas uma geração. A menor repetição CGG a expandir para mutação completa em duas gerações foi de 56 repetições CGG, reportada recentemente por Fernandez-Carvajal *et al*, (2009). Nesta mãe II7 esta indicada a realização de teste SB.



**Família D:**

Amostras testadas: propósito III12, irmão III11, mãe do propósito II6 e prima III2.

Propósito positivo para SXF. Resultado da mãe foi de pré-mutação. A amostra III2 resultou inconclusiva, indicativa para SB.

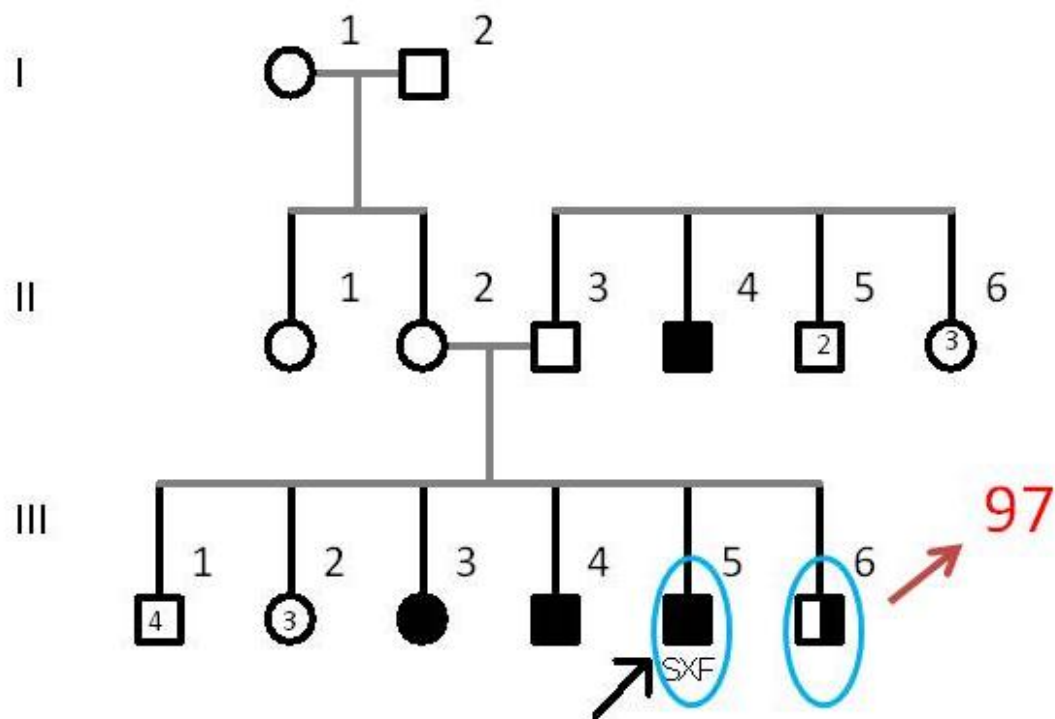


5

**Família E:**

Amostras testadas: propósito III5 e irmão III6.

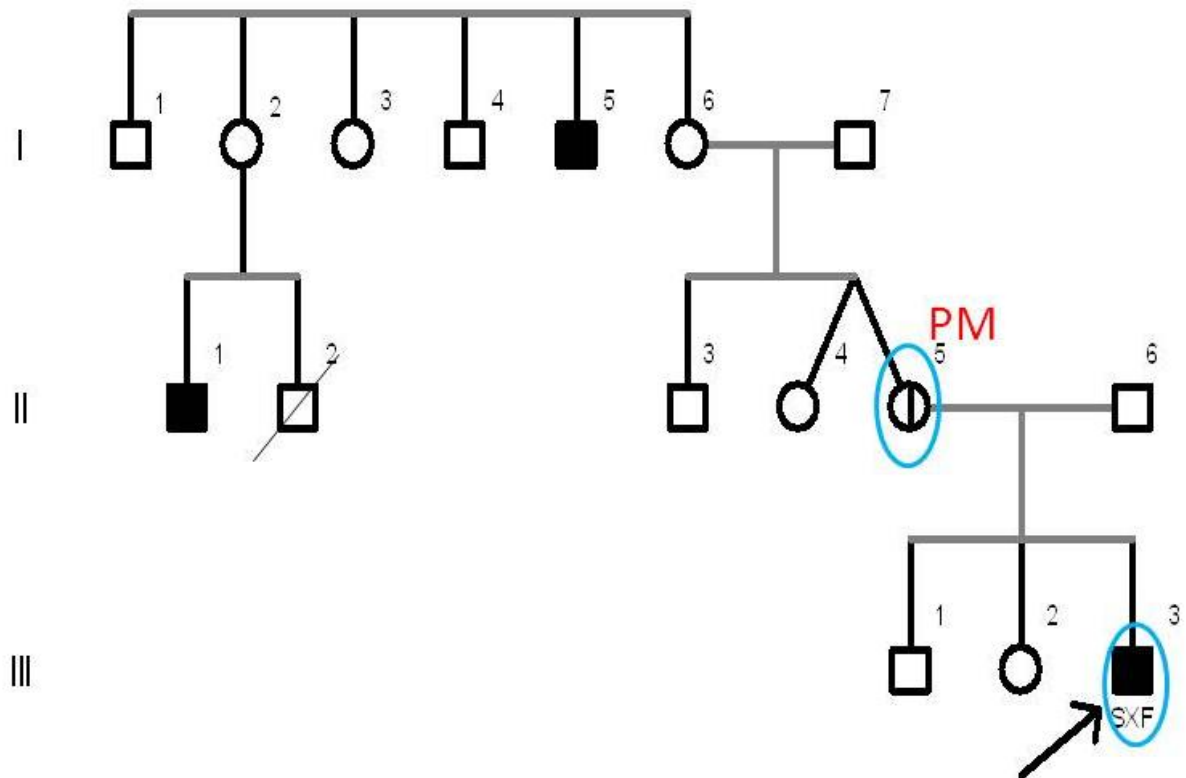
O propósito foi positivo para SXF e possui irmãos III3 e III4 com DM. O irmão III6 apresentou alelo com pré-mutação de 97 repetições CGG. Não obtivemos material da mãe ou de outros familiares para análise. É interessante observar que não foi relatado DM na linhagem materna. No entanto o tio II4 do propósito apresentou DM.



**Família F:**

Amostras testadas: Propósito III3 e mãe II5.

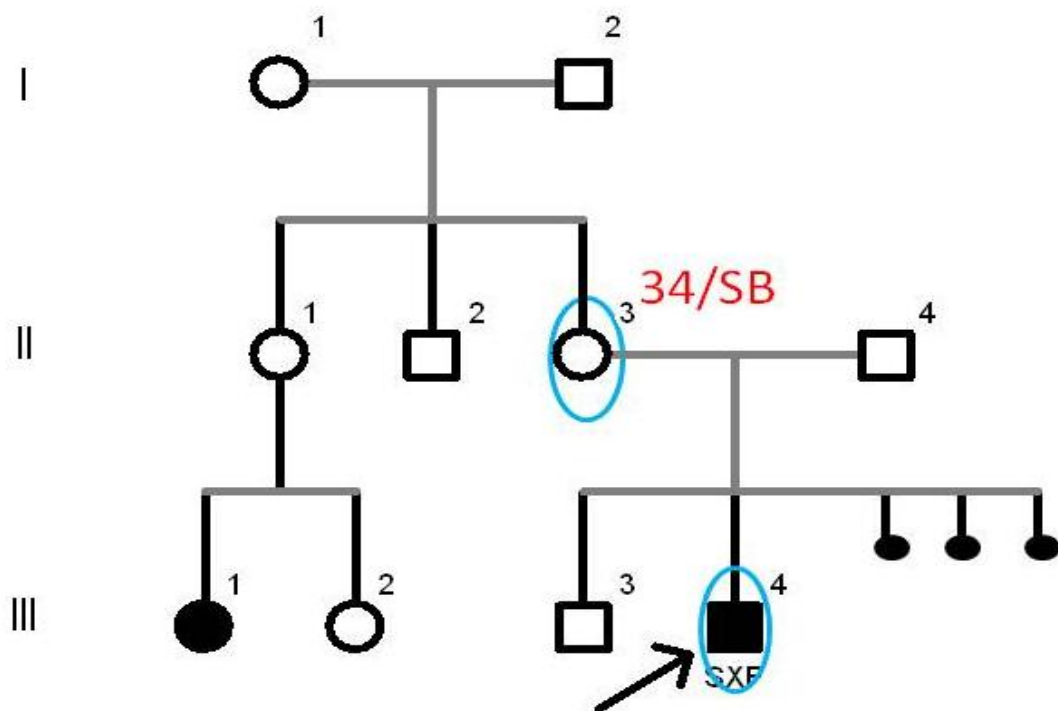
O propósito foi positivo para SXF. Mãe do propósito II5 possui pré-mutação. Nenhuma outra amostra de familiares foi obtida. Pode-se observar, entretanto, que o tio da mãe de origem materna I5 assim como o primo III1 também de origem materna, apresentam o relato de serem portadores de DM.



**Família G:**

Amostras testadas: Propósito III4 e mãe II3.

Propósito positivo para SXF. A mãe inconclusiva, apresentou um alelo de 34 repetições CGG. Possivelmente essa mãe seja mosaico para a mutação completa ou pré-mutação, uma vez que outros membros da família tem relato de DM, e ela apresentou três episódios de aborto espontâneo, característica presente em mulheres de famílias de SXF. Aproximadamente 20% dos pacientes com mutação completa também são mosaicos para a pré-mutação (Macpherson & Sawyer, 2005).

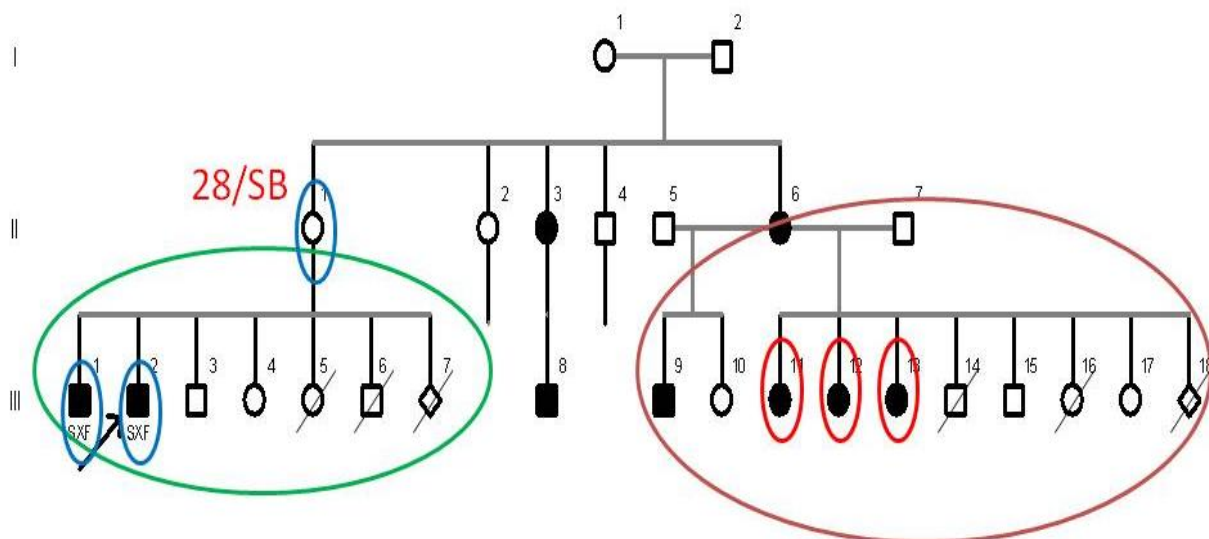


**Familia H:**

Amostras testadas: Propósito III2, irmão III1 e mãe III.

Propósito e irmão positivos para SXF. Amostra da mãe resultou em inconclusiva na eletroforese capilar apresentando um alelo com 28 repetições.

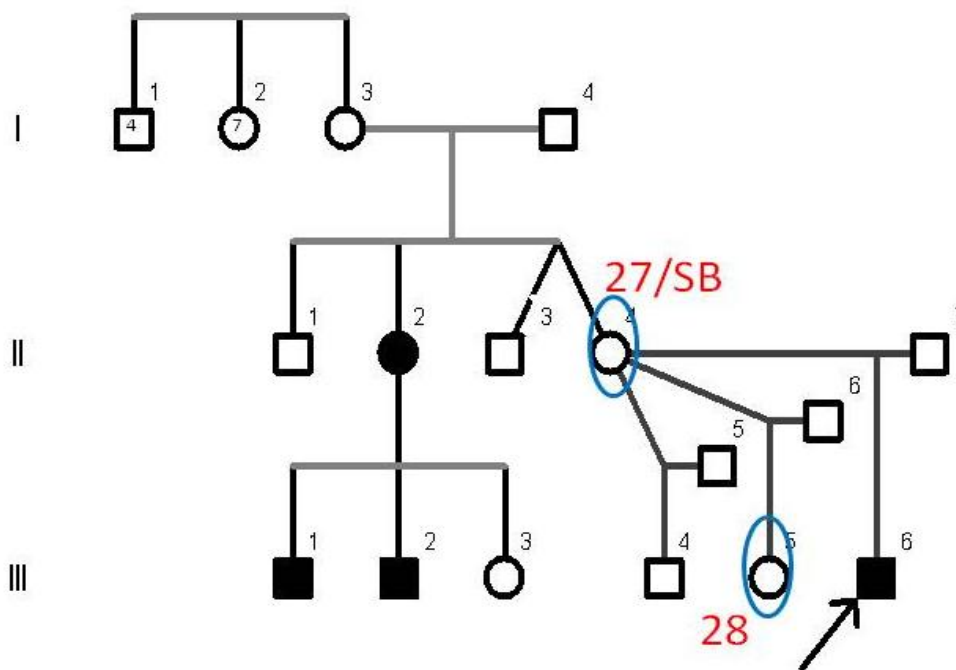
Através de entrevistas e leituras de histórico familiar, foi possível rastrear e agrupar outro ramo da mesma família que havia sido atendida em épocas distintas pelo serviço de genética clínica e que desconheciam a busca recíproca por atendimento em genética clínica. Família com histórico de DM e o ramo da família destacado em vermelho possui sítio frágil identificado por citogenética nos indivíduos III11, III12 e III13 (circulado em vermelho).



**Família I:**

Amostras testadas: Irmã III5 e mãe II4.

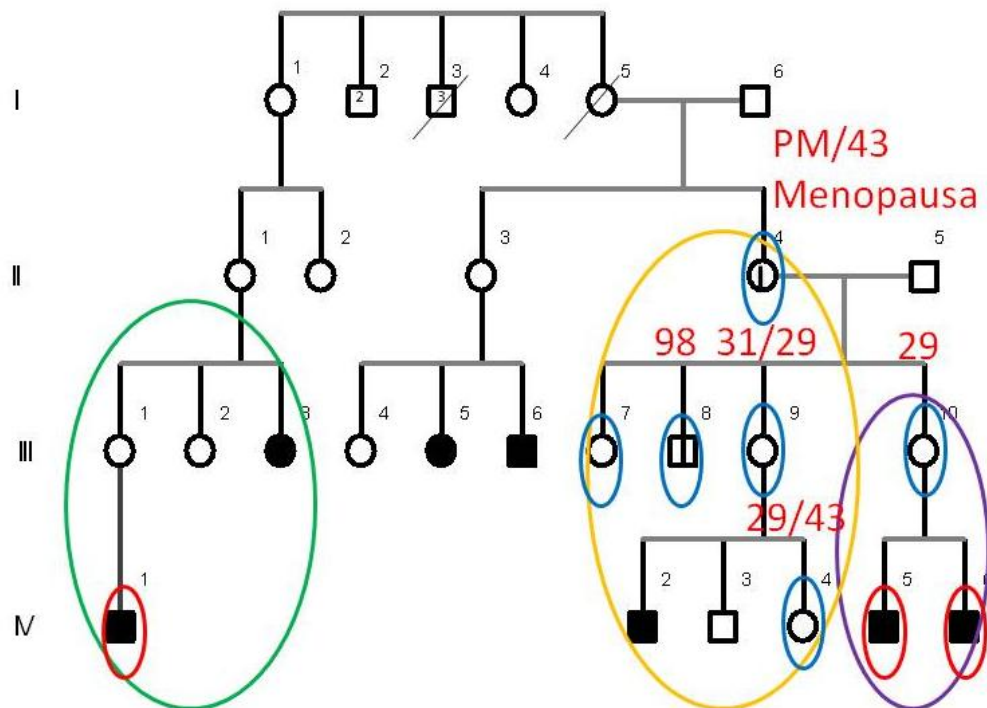
Irmã do propósito é inconclusiva, apresentou apenas um alelo de 28 repetições CGG. A mãe do paciente resultou em inconclusivo com alelo de 27 repetições CGG. Não tivemos acesso ao material do filho, porém em análises anteriores foi indicada a presença de sítio frágil por citogenética. Por dados anamnésicos sabemos que II2, III1 e III2 apresentam DM.



### ***Família J:***

Amostras testadas: II4, III7, III8, III9, III10 e IV4.

II4 relatou menopausa precoce aos 29 anos de idade e apresentou pré-mutação. III7 resultou em normal, enquanto que III8 apresentou um alelo pré-mutado com 98 repetições CGG. III9 resultou em heterozigota apresentando alelos com 31 e 29 repetições CGG. III10 resultou inconclusiva. IV4 apresentou dois alelos normais de 29/43 repetições CGG. Através de entrevistas e análises dos históricos, foi possível identificar outros dois ramos da mesma família, atendidos em épocas distintas pela Genética Clínica onde os indivíduos IV1 e IV2 apresentaram sítio frágil na citogenética.



Na Família J, a mãe (II4) tem pré-mutação e apresentou um alelo de 43 repetições CGG, o outro alelo foi visualizado apenas em PCR CGG-EA ao lado do alelo pré-mutado do filho (III8) com 98 repetições CGG. II4 teve menopausa precoce aos 29 anos de idade. Embora II4 não tenha nenhum filho com DM, seu alelo pré-mutado expandiu na geração seguinte resultando em netos com SXF. Sabendo que em famílias de SXF, o risco de expansão de uma pré-mutação para uma mutação completa varia de acordo com o tamanho do alelo pré-mutado (Heitz *et al*, 1992) e que a probabilidade de conversão para uma mutação completa na transmissão materna numa única geração ultrapassa 90% quando a pré-mutação contém mais de 90 repetições CGG (Wang, *et al*, 1995), a possibilidade de mosaicismos nas filhas da geração III, com possível alelo pré-mutado expandido da mãe II4, não é descartada, uma vez que os netos IV2, IV5 e IV6 têm DM.

Embora a paciente III10 tenha resultado inconclusiva, é possível sugerir a presença do alelo com mutação completa ou pré-mutação, uma vez que gerou dois filhos com SXF. Além de que, de acordo com Macpherson *et al*, (2005), aproximadamente 20% dos pacientes com mutação completa também são mosaicos para a pré-mutação. Neste caso, a reação da PCR deve ter amplificado apenas o alelo normal da mãe. O SB ainda é necessário para averiguar a presença ou ausência de mutação completa nessa família.



### ***Análise dos microssatélites DXS548 e FRAXAC1***

Conforme demonstrado na Tabela 20 seguinte, não foi observado Origem Parental com base nas amostras analisadas quanto aos microssatélites DXS548 e FRAXAC1.

Tabela 20: PCR DXS548 e FRAXAC1 analisadas em eletroforese capilar.

Amostras	Alelos DXS548	Alelos FRAXAC1
Familiar de SXF	197/195	152/150
Familiar de SXF	205/197	156/154
Pré-mutação	205	154
SXF positivo	197	154
SXF positivo	205	158
Masculina normal	197	154
Feminina normal	197/195	158

Para inferir Origem Parental, é preciso que os familiares de afetados e os afetados por SXF apresentem os mesmos alelos tanto para DXS548 como para FRAXAC1, uma vez que estes alelos estão em desequilíbrio de ligação (Dombrowski 2002). A suspeita é fundamentada quando se observa o número de casos positivos para SXF naquela região bem como a formação histórica da população, onde a partir de um pequeno território com poucas famílias se expandiu para a formação territorial e populacional recente. Porém, a suspeita de Origem Parental foi descartada, uma vez que as famílias apresentaram alelos diferentes para DXS548 e FRAXAC1.

Ainda se faz necessário utilizar de outras abordagens populacionais e uma amostragem mais ampla da região, uma vez que nem todas as famílias positivas para SXF de Unaí-MG foram investigadas e as investigadas apresentaram alelo 197 e 195 de DXS548 com maior frequência associado ao alelo 154 de FRAXAC1.

## ***CONCLUSÃO***

O diagnóstico de DM na rotina de um ambulatório clínico é trabalhoso e exige tanto uma triagem eficiente no atendimento clínico quanto o uso de testes moleculares que certifique ou descarte uma origem genética do DM. Através da associação de dois métodos de PCR para análise da região CGG do gene *FMRI*, foi possível implementar uma metodologia de triagem molecular para a SXF em DM, bem como para indivíduos com FXTAS (Síndrome de Tremor e Ataxia associada ao X frágil) e menopausa precoce.

A triagem se mostrou capaz de identificar portadores de mutação completa e portadores de pré-mutação no gene *FMRI*, bem como mulheres heterozigotas para alelos CGG de tamanho semelhantes. Foi possível obter a frequência de 8,16% de SXF nos indivíduos com DM atendidos pelo Serviço de Genética Clínica do HUB/UnB.

Esta metodologia diminui significativamente a necessidade de realização de SB. Uma vez excluído o diagnóstico de SXF, outras abordagens poderão ser utilizadas para se investigarem causas menos frequentes de DM, principalmente outras formas de DM ligado ao cromossomo X.

## ***REFERÊNCIAS***

- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Vieri F, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999 Apr 2;83(4):322-5.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV. American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994.
- Ashley-Koch AE, Robinson H, Glicksman AE, Nolin SL, Schwartz CE, Brown WT, Turner G, Sherman SL. Examination of factors associated with instability of the FMR1 CGG repeat. *Am J Hum Genet.* 1998 Sep;63(3):776-85.
- Biancalana V, Macpherson J. Fragile X disease. *Methods Mol Med.* 2004;92:157-82.
- Butler, M. G., Mangrum, T., Gupta, R. & Singh, D. N. (1991) 'A 15-Item Checklist for Screening Mentally Retarded Males for the Fragile X Syndrome', *Clinical Genetics* 39:347-54.
- Chakravarti, A. Fragile X founder effect? *Nature Genet.* 1: 237-238, 1992.
- Chelly, J., Khelifaoui, M., Francis, F., Shefir, B. and Bienvenu, T. Genetic and pathophysiology of mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 701-713 (2006)
- Chiurazzi P, Genuardi M, Kozak L, Giovannucci-Uzielli ML, Bussani C, Dagna-Bricarelli F, Grasso M, Perroni L, Sebastio G, Sperandeo MP, Oostra BA, Neri G. Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1996 Jul 12;64(1):209-15.
- Chiurazzi, P., Schwartz, C.E., Gees, J., Neri, G. XLMR genes: update 2007. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 422-434 (2008).
- Christofolini DM, Abbud EM, Lipay MV, Costa SS, Vianna-Morgante AM, Bellucco FT, Nogueira SI, Kulikowski LD, Brunoni D, Juliano Y, Ramos MA, Melaragno MI.

- Evaluation of clinical checklists for fragile X syndrome screening in Brazilian intellectually disabled males: proposal for a new screening tool. *J Intellect Disabil.* 2009 Sep;13(3):239-48.
- Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. 1999. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat. Genet.* 22:98–101. Erratum. 1999. *Nat. Genet.* 22(2):209
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5401-4.
- Crawford DC, Schwartz CE, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Gunter C, Brown WT, Carpenter NJ, Howard-Peebles PN, Monaghan KG, Nolin SL, Reiss AL, Feldman GL, Rohlfes EM, Warren ST, Sherman SL. Survey of the fragile X syndrome CGG repeat and the short-tandem-repeat and single-nucleotide-polymorphism haplotypes in an African American population. *Am J Hum Genet.* 2000;66:480–493.
- Croen LA, Grether JK, Selvin S. The epidemiology of mental retardation of unknown cause. *Pediatrics.* 2001;107(6):e86.
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 1993 Jan;3(1):31-5.
- De Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 660–667.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.* 1993 Aug;4(4):335-40.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1147–1153.
- Faria, A. P. M. (2006) 'Investigação diagnóstica do Deficiência Mental: diretrizes, normas e condutas'. [www.fcm.unicamp.br/diretrizes/site\\_diretrizes\\_normas\\_condutas\\_fcm/invest\\_diag\\_ret\\_ment/invest\\_diag\\_ret\\_ment\\_pg1.html](http://www.fcm.unicamp.br/diretrizes/site_diretrizes_normas_condutas_fcm/invest_diag_ret_ment/invest_diag_ret_ment_pg1.html).

- Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*. 1997 Dec;1(1):109-18.
- Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ, Tassone F. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn*. 2009 Jul;11(4):306-10. Epub 2009 Jun 12.
- Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, Hagerman PJ, Stenzel TT, Hadd AG, Latham GJ, Tassone F. A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem*. 2010 Mar;56(3):399-408. Epub 2010 Jan 7.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1047-58.
- Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, Wenger SL. A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr*. 1996 Oct;129(4):611-4.
- Haataja R, Väisänen ML, Li M, Ryyänen M, Leisti J. The fragile X syndrome in Finland: demonstration of a founder effect by analysis of microsatellite haplotypes. *Hum Genet*. 1994 Nov;94(5):479-83.
- Hagerman RJ. Fragile X syndrome. Molecular and clinical insights and treatment issues. *West J Med*. 1997 Feb;166(2):129-37.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behaviour relationship. *Rev Neurol*. 2001 Oct;33 Suppl 1:S51-7.
- Hagerman PJ, Hagerman RJ. The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet*. 2004 May;74(5):805-16. Epub 2004 Mar 29.
- Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X checklist. *Am J Med Genet*. 1991 Feb-Mar;38(2-3):283-7.

- Hagerman RJ. Annotation: fragile X syndrome: advances and controversy. *J Child Psychol Psychiatry*. 1992 Oct;33(7):1127-39.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Jun;12(3):278-83.
- Hantash FM, Goos DM, Crossley B, Anderson B, Zhang K, Sun W, Strom CM. 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. *Genet Med*. 2011 Jan;13(1):39-45.
- Harrison cj, Jackem,allen td, Harris r. 1983. The fragile x: a scanning electron microscope study. *J. Med. Genet*. 20:280–85
- Hawkins M, Boyle J, Wright KE, Elles R, Ramsden SC, O'Grady A, Sweeney M, Barton DE, Burgess T, Moore M, Burns C, Stacey G, Gray E, Metcalfe P, Hawkins JR. Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011 Jan;19(1):10-7. Epub 2010 Aug 25.
- Heitz D, Devys D, Imbert G, Kretz C, Mandel JL. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet*. 1992 Nov;29(11):794-801.
- Howard-Peebles PN, Stoddard GR. X-linked mental retardation with macro-orchidism and marker X chromosomes. *Hum Genet*. 1979 Sep;50(3):247-51.
- Hundscheid RD, Sistermans EA, Thomas CM, Braat DD, Straatman H, Kiemeney LA, Oostra BA, Smits AP. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):413-8.
- Inlow JK, Restifo LL. Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics*. 2004 Feb;166(2):835-81.
- Irwin SA, Galvez R, Greenough WT. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex*. 2000 Oct;10(10):1038-44.
- Irwin SA, Idupulapati M, Gilbert ME, Harris JB, Chakravarti AB, Rogers EJ, Crisostomo RA, Larsen BP, Mehta A, Alcantara CJ, Patel B, Swain RA, Weiler IJ, Oostra BA, Greenough WT. Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V

pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am J Med Genet.* 2002 Aug 1;111(2):140-6.

Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J. A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R., Berry-Kravis, E., Brown, W. T., Schaeffer, S., Kissel, J., Tassone, F., Hagerman, P. J. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 869-878, 2003.

Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, Zhang L, Jardini T, Gane LW, Harris SW, Herman K, Grigsby J, Greco CM, Berry-Kravis E, Tassone F, Hagerman PJ. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA.* 2004 Jan 28;291(4):460-9.

Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000 Apr 12;9(6):901-8.

Jorde, L.B.; Carey, J.C.; Bamshad, M.J.; White, R.C. *Genética médica.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

Kabra M, Gulati S. Mental retardation. *Indian J Pediatr.* 2003 Feb;70(2):153-8.

Khaniani MS, Kalitsis P, Burgess T, Slater HR. An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMR1). *Mol Cytogenet.* 2008 Apr 8;1:5.

Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M, Holden JJ, Torroni A, Nelson DL, Warren ST. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet.* 1996 Mar;58(3):513-22.

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 15;10(4):329-38.

Laing S, Partington M, Robinson H, Turner G. Clinical screening score for the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am J Med Genet.* 1991 Feb-Mar;38(2-3):256-9.

Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 1;29(11):2276-83.



- Lubs, H. A., Jr. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21: 231-244, 1969.
- Lubs, H. A., Watson, M., Breg, R., Lujan, E. Restudy of the original marker X family. *Am. J. Med. Genet.* 17: 133-144, 1984.
- Macpherson J, Sawyer H: Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome. Clinical Molecular Genetics Society, 2005, <http://cmgsweb.shared.hosting.zen.co.uk/BPGs/pdfs%20current%20bpgs/Fragile%20X.pdf>.
- Maes b, Fryns jp, Ghesquiere p, Borghgraef m: Phenotypic checklist to screen for fragile x syndrome in people with mental retardation. *Ment retard* 2000; 38: 207– 215
- Malmgren H, Gustavson KH, Oudet C, Holmgren G, Pettersson U, Dahl N. Strong founder effect for the fragile X syndrome in Sweden. *Eur J Hum Genet.* 1994;2(2):103-9.
- Merenstein SA, Sobesky WE, Taylor AK, Riddle JE, Tran HX, Hagerman RJ. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet.* 1996 Aug 9;64(2):388-94.
- Mingroni-Netto RC, Angeli CB, Auricchio MT, Leal-Mesquita ER, Ribeiro-dos-Santos AK, Ferrari I, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Vianna-Morgante AM. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *Am J Med Genet.* 2002 Aug 15;111(3):243-52.
- Mingroni-Netto RC, Haddad LA, Vianna-Morgante AM. The number of CGG repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism. *Am J Med Genet.* 1996 Aug 9;64(2):270-3.
- Morton NE, Macpherson JN. Population genetics of the fragile-X syndrome: multiallelic model for the FMR1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):4215-7.
- Murray A. Premature ovarian failure and the FMR1 gene. *Semin Reprod Med.* 2000;18(1):59-66.
- Napierala M, Michalowski D, de Mezer M, Krzyzosiak WJ. Facile FMR1 mRNA structure regulation by interruptions in CGG repeats. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 19;33(2):451-63. Print 2005.

- Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen ML, von Koskull H, Sherman SL. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* 2003 Feb;72(2):454-64. Epub 2003 Jan 14.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 1991 May 24;252(5009):1097-102.
- Oostra BA, Willemsen R. Diagnostic tests for fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001 Jul;1(2):226-32.
- Oostra BA, Willemsen R. FMR1: a gene with three faces. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1790(6):467-77. Epub 2009 Feb 21.
- Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:575-621.
- Peprah EK, Allen EG, Williams SM, Woodard LM, Sherman SL. Genetic diversity of the fragile X syndrome gene (FMR1) in a large Sub-Saharan West African population. *Ann Hum Genet.* 2010 Jul;74(4):316-25.
- Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci.* 2002 Apr;25(4):191-9.
- Richards RI, Holman K, Kozman H, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Yu S, Mulley J, Sutherland GR. Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet.* 1991 Dec;28(12):818-23.
- Riddle JE, Cheema A, Sobesky WE, Gardner SC, Taylor AK, Pennington BF, Hagerman RJ. Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. *Am J Ment Retard.* 1998 May;102(6):590-601.
- Riggins GJ, Sherman SL, Oostra BA, Sutcliffe JS, Feitell D, Nelson DL, van Oost BA, Smits AP, Ramos FJ, Pfendner E, et al. Characterization of a highly polymorphic dinucleotide repeat 150 KB proximal to the fragile X site. *Am J Med Genet.* 1992 Apr 15-May 1;43(1-2):237-43.

- Ritney CD. Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Mar;74 Suppl 1:i30-6.
- Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*. 2005 Jan;6(1):46-57.
- Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, Der Kaloustian VM. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR-1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum Mol Genet*. 1994 Jun;3(6):927-30.
- Saluto A, Brussino A, Tassone F, Arduino C, Cagnoli C, Pappi P, Hagerman P, Migone N, Brusco A. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. *J Mol Diagn*. 2005 Nov;7(5):605-12.
- Sherman SL, Turner G, Sheffield L, Laing S, Robinson H. Investigation of the twinning rate in families with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1988 May-Jun;30(1-2):625-31.
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):291-8.
- Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibodeau SN. Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet*. 1993 Dec;53(6):1217-28.
- Warren ST. Trinucleotide repetition and fragile X syndrome. *Hosp Pract (Minneap)*. 1997 Apr 15;32(4):73-6, 81-5, 90-2 passim.
- Stevenson RE. Splitting and lumping in the nosology of XLMR. *Am J Med Genet*. 2000 Fall;97(3):174-82.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 1992 Sep;1(6):397-400.
- Sutherland GR, Ashforth PL. X-linked mental retardation with macro-orchidism and the fragile site at Xq 27 or 28. *Hum Genet*. 1979 Apr 17;48(1):117-20.

- Tassone F, Hagerman RJ, Loesch DZ, Lachiewicz A, Taylor AK, Hagerman PJ. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet.* 2000 Sep 18;94(3):232-6.
- Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000 Fall;97(3):195-203.
- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1996 Jul 12;64(1):196-7.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 1991 May 31;65(5):905-14.
- Verkerk AJ, de Graaff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, et al. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet.* 1993 Aug;2(8):1348.
- Vianna-Morgante AM, Costa SS. Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):254-5; author reply 256-8.
- Vianna-Morgante AM, Armando I, Frota-Pessoa O. Escalante syndrome and the marker X chromosome. *Am J Med Genet.* 1982 Jun;12(2):237-40.
- Wang Q, Green E, Bobrow M, Mathew CG. A rapid, non-radioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J Med Genet.* 1995 Mar;32(3):170-3.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5395-400.
- Willemsen R, Mientjes E, Oostra BA. FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with Fragile X premutation. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005 Sep;5(5):405-10.

Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, Corrigan EC, Simpson JL, Nelson LM. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):456-65. Epub 2006 Oct 30.

World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders (World Health Organization, Geneva, 1992).

Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley J, Warren S, Schlessinger D, Et A. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*. 1991 May 24;252(5009):1179-81.