



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa – PROPE**  
**Mestrado em genética – MGENE**  
**Núcleo de Pesquisas Replicon**

**FERNANDA CARLA STEGANI**

**DESAFIOS NA AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE  
PACIENTES COM SUSPEITA DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL  
ATENDIDOS NA REDE PÚBLICA DE SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS**

**Goiânia**  
**2011**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa – PROPE**  
**Mestrado em genética – MGENE**  
**Núcleo de Pesquisas Replicon**

**FERNANDA CARLA STEGANI**

**DESAFIOS NA AVALIAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE  
PACIENTES COM SUSPEITA DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL  
ATENDIDOS NA REDE PÚBLICA DE SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva.

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Aparecido Divino Cruz, PhD.

**Goiânia**

**2011**

---

S817d Stegani, Fernanda Carla

Desafios na avaliação genético-molecular de pacientes com suspeita de Síndrome do X-Frágil atendidos na rede pública de saúde do Estado de Goiás / Fernanda Carla Stegani. – Goiânia, 2011.

88 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2011.

“Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva”

**1. Síndrome do X-frágil – Goiás. 2. Deficiência intelectual – transtornos neuro-psiquiátricos – Goiás. 3. Biologia molecular. I.Título.**

---

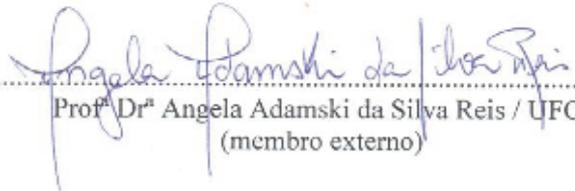
CDU: 577:616.896(817.3) (043)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 08 DE DEZEMBRO DE 2011 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

20,0 (dez pontos)

  
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD - PUC Goiás  
(presidente-orientador)

  
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás  
(membro interno)

  
Prof. Dr. Angela Adamski da Silva Reis / UFG  
(membro externo)

## **Agradecimentos**

Esse trabalho resume bem a máxima de que sozinho não fazemos nada. Por isso registro aqui meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção e realização desse.

Primeiramente agradeço a Deus por guiar-me sempre pelos melhores caminhos, com saúde, paciência e força para enfrentar os desafios diários.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Melo e Silva pela oportunidade de crescimento profissional, pessoal e pela sua paciência, orientação e ensinamentos.

Aos meus pais Luiz Carlos Stegani e Cleuza da Costa Steagani, irmãos Márcio Augusto Stegani e Daiany Kelly Stegani e meu marido Hamilton de Oliveira Castro por tudo que fizeram e fazem por mim. Pela base sólida que tenho como família. Juntos somos um só, por isso essa vitória compartilho com vocês. Amo-os incondicionalmente.

À meu co-orientador Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz pelo apoio, incentivo e ajuda técnica.

Um especial agradecimento às Profas. Caroline Oliveira Araújo Melo e Emília Oliveira Alves Costa; às mestrandas Andréia Pires Amâncio e Fernanda Ribeiro Godoy e à bióloga Damiana Mirian da Cruz e Cunha pela receptividade no laboratório, presteza em ajudar e sua eficiência com a técnica de MLPA, sem o qual esse projeto não teria sido concluído, meu muito obrigada!

Ao Professor Dr. Roberto Edward Pogue (UCB) e seu aluno de mestrado, Felipe Albuquerque Marques pela parceria.

À Dra. Maria das Graças Brasil pela confiança e encaminhamento dos pacientes com suspeita da SXF ao LaGene.

Aos amigos de turma, especialmente Celina K. K. Suzuki e Luciana A. A. Machado que compartilharam as dificuldades e alegrias enfrentadas nesses anos, vocês são inesquecíveis.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares pela participação nesse estudo.

Meu muito Obrigada!

## RESUMO

A Deficiência Intelectual (DI) é definida como uma incapacidade caracterizada por limitações significativas, tanto no funcionamento intelectual quanto no comportamento adaptativo e está expressa nas habilidades práticas, sociais e conceituais, originando-se antes dos 18 anos de idade. É um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes, com taxa de prevalência de 5% na população brasileira. A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a forma mais frequente, mais pesquisada e melhor documentada de DI herdável em seres humanos. O fenótipo da SXF está associado a mutações no gene FMR1 (*Fragile X-linked Mental Retardation type 1*) e abrange um amplo espectro de envolvimento físico e comportamental. É causada por uma expansão de trinucleotídeos CGG no primeiro éxon do gene FMR1 localizado na região Xq27.3 no cromossomo X. Em função de sua diversidade fenotípica, esta doença tem sido subdiagnosticada na população pediátrica. A importância do reconhecimento clínico e diagnóstico específico da SXF vem do fato de que teoricamente todos os casos são hereditários e familiares. Entre as técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico da SXF, a MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) tem sido considerada promissora. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo validar o diagnóstico genético-molecular de pacientes com suspeita da SXF no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, na cidade de Goiânia, pela técnica de MLPA. Foram selecionados 33 pacientes encaminhados pelo serviço médico da rede pública de saúde ao LaGene com indicação clínica de diagnóstico da SXF. Para realização da análise por MLPA foi utilizado o Kit: Salsa MLPA P106-B1 MRX. Foram obtidas amplificações de apenas 15% dos pacientes. O Kit utilizado não detectou alterações no número de cópias do gene FMR1 em nenhum paciente analisado, sendo necessário a utilização de outros métodos moleculares para confirmação do diagnóstico da SXF. Dessa forma, concluímos que o Kit utilizado não foi específico para detectar alterações no número de cópias do gene FMR1, não se mostrou sensível e específico na detecção de portadores da SXF, sendo considerado oneroso. Assim a técnica de MLPA, com o uso do Kit Salsa MLPA P106-B1 MRX, não deverá ser utilizada para se triar pacientes com suspeita da SXF.

**Palavras-chave:** Síndrome X-Frágil, deficiência intelectual, diagnóstico genético-molecular, MLPA.

## ABSTRACT

The Intellectual Disability (ID) is defined as a disability characterized by significant limitations both in intellectual functioning and in the adaptive behavior and it is expressed in practical, social and conceptual skills, originating before the age of 18. It is one of the most common neuropsychiatric disorders in children and adolescents, with a 5% prevalence in our population. The Fragile X Syndrome (FXS) is the most frequent and best documented DI heritable in humans. The phenotype of FXS is associated with mutations in the gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation-linked type 1) and it covers a broad spectrum of behavioral and physical involvement. It is caused by a CGG trinucleotide expansion in the first exon of the FMR1 gene located in the region Xq27.3 on the X chromosome. Because of its phenotypic diversity, this disease has been under diagnosed in the pediatric population. Among the techniques used for molecular diagnosis of FXS, the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) has been considered promising. In this context, this study aimed to validate the molecular diagnosis of patients suspected of FXS in the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics (Lagene) by the MLPA technique. We selected 33 patients referred by medical from public health to Lagene with clinical of FXS. To perform the analysis by MLPA the Salsa MLPA P106-B1 MRX kit was used. The amplicons were obtained only for 15% of the patients. The MLPA kit used did not detect changes in the copy number of the FMR1 gene in any examined patient, being useful the need of other molecular methods to confirm the diagnosis of FXS. Thus, we concluded that such MLPA kit was not useful to detect specific changes in the copy numbers of the FMR1 gene. So the Salsa MLPA Kit P106-B1 MRX should not be used to the trial of patients with FXS.

**Keywords:** Fragile X syndrome, intellectual disabilities, molecular genetic diagnosis, MLPA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O cromossomo X com uma falha em seu braço longo - FRAXA(q27.3) - presente nos indivíduos afetados pela SXF .....	23
Figura 2: Cromossomo X e gene FMR1 com número de repetições. Categorias: normal; zona cinza; pré-mutação e mutação completa .....	24
Figura 3: Formas alteradas de transmissão do FMR1. Homens e mulheres poderão ser normais, ou portadores da pré-mutação, ou afetados pela mutação completa .....	25
Figura 4: Ideograma do cromossomo X indicando o mapa físico do gene FMR1 localizado no Xq27.3 .....	28
Figura 5: Gene FMR1 no estado normal, pré-mutado e mutado completamente ..	29
Figura 6: Representação esquemática das sondas comerciais de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas, à esquerda e à direita, que se anelam de maneira adjacente .....	44
Figura 7: Representação esquemática do procedimento adotado nas reações de MLPA.....	45
Figura 8: MLPA comparado às outras técnicas. ....	46
Figura 9: Resultado da amplificação das 47 sondas do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX para o controle negativo masculino .....	56
Figura 10: Resultado da amplificação de 37 sondas do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX para o paciente 1 .....	57
Figura 11: Resultado da amplificação de 39 das 47 sondas no paciente 2.....	58
Figura 12: Resultado da amplificação de 38 das 47 sondas no paciente 3.....	59
Figura 13: Resultado da amplificação de 15 das 47 sondas no paciente 4.....	60
Figura 14: Resultado da amplificação de 27 das 47 sondas no paciente 5.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos métodos para diagnóstico laboratorial da SXF .....	14
Tabela 2: Características Comportamentais da SXF .....	35
Tabela 3: Pacientes encaminhados ao LaGene, de setembro de 2010 a julho de 2011, com indicação clínica da SXF.....	52
Tabela 4: Programa utilizado para a realização das reações de MLPA .....	53
Tabela 5: Genes do cromossomo X analisados com SALSA P106-B1 .....	55

## LISTA DE ABREVIACÕES

- AAIDD: *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (Associação Americana de disfunções intelectuais e desenvolvimentais)
- AGG: Adenina-guanina-guanina
- AN: Alelos normais
- AUG: Adenina-uracila-guanina
- BP-1: *Beta protein 1* (Beta proteína 1)
- CEP: Comitê de tica em pesquisa
- CGG: Citosina-guanina-guanina
- CID: Classificação internacional de doenças
- CpG: Ilha rica em citosina e guanina
- DI: Deficiência intelectual
- DNA: cido desoxirribonucléico
- dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- DSM: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Manual estatístico e de diagnósticos de doenças mentais)
- DXS52: Marcador microssatelite localizado no cromossomo X, segmento 52
- EagI: Enzima de restrição EagI
- EcoRI: Enzima de restrição EcoRI
- FMR1: *Fragile X-linked Mental Retardation type 1* (Gene do retardo mental ligado ao cromossomo X tipo 1)
- FMR2: *Fragile X-linked Mental Retardation type 2* (Gene do retardo mental ligado ao cromossomo X tipo 2)
- FMRP: *Fragile X Mental Retardation Protein* (Proteína do Retardo Mental do X-Frágil)
- FOP: Falha ovariana precoce
- FRAXA: Sítio frágil A
- FRAXD: Sítio frágil D
- FRAXE: Sítio frágil E
- FRAXF: Sítio frágil F
- FXR1: *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1* (Síndrome do retardo mental ligado ao X-Frágil relacionado à proteína 1)
- FXR2: *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2* (Síndrome do retardo mental ligado ao X-Frágil relacionado à proteína 2)
- FXTAS: Síndrome de ataxia e tremor associada ao X-Frágil
- g: Gramas
- K: Proteína K

Kb: Quilobases  
KD: Kilodaltons  
KH: Homólogos à proteína K  
LaGene: Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás  
Mb: Megabases  
MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (Amplificação de Múltiplas Sondas Dependente de Ligação)  
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro  
NES: *Nuclear exportation signal* (sinal de exportação nuclear)  
ng: Nanogramas  
NLS: *Nuclear localization signal* (sinal de localização nuclear)  
nt: Nucleotídeos, bases  
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)  
PUC: Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
QI: Quociente intelectual  
RNA: Ácido ribonucléico  
RNPs: Ribonucleoproteínas  
SB: *Southern Blotting*  
SGC: Sociedade Goiana de Cultura  
SXF: Síndrome do X-Frágil  
SUS: Sistema único de saúde  
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido  
12q13: Braço longo do cromossomo 12, região 1, banda 3  
17p13.1: Braço curto do cromossomo 17, região 1, banda 3  
Xq28: Braço longo do cromossomo X, região 2, banda 8  
Xq27.3: Braço longo do cromossomo X, região 2, banda 7, sub-banda 3  
< : Menor que

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Doenças Genéticas .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Herança autossômica dominante .....	15
1.1.2 Herança autossômica recessiva.....	16
1.1.3 Herança dominante ligada ao X .....	16
1.1.4 Herança recessiva ligada ao X.....	16
<b>1.3 Deficiência Intelectual (DI).....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Síndrome do X-Frágil (SXF).....</b>	<b>22</b>
1.4.1 História e Definição .....	22
1.4.2 Herança Genética .....	25
1.4.3 Gene FMR1 .....	27
1.4.4 Proteína FMRP.....	31
1.4.5 Características clínicas da SXF.....	33
1.4.6 Diagnóstico da SXF .....	36
1.4.6.1 <u>Métodos Moleculares</u> .....	39
1.4.6.1.1 <i>Southern Blotting</i> .....	39
1.4.6.1.2 <i>PCR</i> .....	40
1.4.6.1.3 <i>MLPA</i> .....	42
1.4.7 Aconselhamento Genético .....	46
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>48</b>
<b>3 CAPÍTULO 1 – ESTUDO DE CASO</b>	
<b>AVALIAÇÃO DA MLPA NA TRIAGEM DE PACIENTES COM SUSPEITA DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL: A EXPERIÊNCIA DE GOIÂNIA NO SUS .....</b>	<b>49</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>49</b>
<b>2 Material e Métodos .....</b>	<b>50</b>
2.1 Casuística.....	50
2.2 Extração e Quantificação das Amostras.....	52
2.3 Reações de MLPA .....	52
2.4. Análise dos dados.....	53

<b>3 Resultados</b> .....	<b>53</b>
3.1 Amplificação das sondas.....	55
3.2 Análises dos pacientes.....	55
<b>4 Discussão</b> .....	<b>61</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>64</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>65</b>
<b>ANEXO I</b>	
<b>KIT SALSA MLPA</b> .....	<b>74</b>
<b>ANEXO II</b>	
<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXO III</b>	
<b>DECLARAÇÃO</b> .....	<b>88</b>

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 Introdução

A deficiência intelectual (DI) isolada ou associada a anomalias congênitas é um dos principais fatores de redução da qualidade de vida. Para o indivíduo e sua família, a DI representa limitação em diferentes graus, em geral determinando necessidade de supervisão, suporte e proteção permanente. Para os gestores públicos, a DI deve ser considerado um problema de saúde pública devido à sua prevalência alta. Em geral, para a população a DI impõe consequências negativas para a produtividade e as relações sociais causando transtornos e constrangimentos desnecessários aos pacientes e suas famílias (VASCONCELOS, 2004).

Trata-se de uma condição complexa, identificada pela redução substancial das funções intelectuais, concomitante a déficits no comportamento adaptativo, com limitações observadas em duas ou mais áreas como comunicação, cuidados pessoais, cotidiano, senso de direção, funções acadêmicas, trabalho, saúde e lazer (FRANÇA *et al.*, 2011).

No Brasil, segundo dados do Censo Demográfico de 2000, existem ao menos 24 milhões de pessoas com pelo menos uma forma de deficiência intelectual ou física, representando, aproximadamente, 15% da população. Entre os afetados, em torno de 2,8 milhões (ou 1,6% da população residente) seriam deficientes intelectuais. Os dados nacionais provavelmente encontram-se subestimados, porém os números atuais são suficientes para considerar a DI como um problema de saúde pública (CARDOZO e SOARES, 2011).

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a forma mais frequente, mais pesquisada e melhor documentada de deficiência intelectual herdável em seres humanos. No âmbito das etiologias genéticas mais frequentes de deficiência intelectual, a SXF é precedida apenas pela trissomia do cromossomo 21 (YIM *et al.*, 2008). Sua incidência é de 1 em 4.000 no sexo masculino e 1 em 6000 no sexo feminino (LIANG *et al.*, 2008). A SXF ocorre em todos os grupos étnicos e é responsável por 30% de todos os casos de deficiência intelectual hereditária (RUIZ *et al.*, 2009).

O reconhecimento clínico e diagnóstico específicos corretos tem implicações importantes no acompanhamento e na atenção à saúde dos afetados. A priori, todos os casos são hereditários e familiares (VEIGA e TORALLES, 2002). Portanto, mesmo

na ausência de um tratamento específico o diagnóstico da SXF precoce provê oportunidade para intervenção educativa e terapêutica. A identificação de indivíduos afetados é importante para o aconselhamento genético familiar de membros sob o risco de serem portadores da pré-mutação, com medidas de prevenção secundária através do diagnóstico pré-natal, o que reduziria o risco de recorrência com consequente diminuição de custos institucionais de saúde pública (BHOGAL e JONGENS, 2010).

Na SXF há uma grande variabilidade de sinais e uma ampla diversidade fenotípica, que podem complicar o diagnóstico clínico (LAMONICA *et al.*, 2011). Este fato aliado à frequência relativamente alta da síndrome entre indivíduos com DI, torna compulsório a realização de testes moleculares para investigar a SXF, uma vez que os testes disponíveis oferecem sensibilidade e especificidade satisfatórios para o diagnóstico correto (LIANG *et al.*, 2008).

As técnicas padrão de laboratório para diagnóstico da SXF são capazes de indicar, como a citogenética e MLPA (*Multiplex Ligationdependent Probe Amplification*) e quantificar, como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *Southern Blotting* o número de repetições CGG na região 5' do gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*). A Tabela 1 demonstra as vantagens e desvantagens de cada técnica (STEINER *et al.*, 2005).

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos métodos para diagnóstico laboratorial da SXF.

Método	Vantagens	Desvantagens
Citogenética	Analisa os cromossomos, permitindo a identificação das estruturas, anormalidades estruturais e o sítio frágil.	Tempo gasto; Risco de resultado falso positivo; Não diferencia FRAXA de FRAXE; Não detecta portadores; Não identifica mutação pontual.
PCR	Resultado rápido; Utiliza pequena amostra de DNA;	Confirmação apenas para SXF em homens; Risco de resultado inconclusivo; Risco de não detectar portadores; Não identifica mutação pontual.
<i>Southern Blotting</i>	Confiável para homens e mulheres, incluindo portadores.	Tempo consumido; Alto custo; Utiliza grande amostra de DNA;
MLPA	Identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente; Rapidez nos resultados.	Alto custo; Requer DNA de alta qualidade; Difícil padronização.

Fonte: Stener *et al.* (2005).

Entre as técnicas utilizadas para detectar a SXF, a técnica de MLPA tem sido considerada a mais promissora, por ser um método sensível e rápido, que visa quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (UEHARA, 2010).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo validar o diagnóstico genético-molecular de pacientes com suspeita da SXF no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, utilizando a técnica de MLPA.

## 1.2 Doenças Genéticas

É importante compreender que doença genética não é sinônimo de doença hereditária. Doença genética é todo e qualquer distúrbio que afete o material genético. Portanto, qualquer doença não infecciosa e não contagiosa que afete o material genético, em maior ou menor escala, é uma doença genética (GARRAFA, 1997). Algumas características genéticas dependem não só dos genes, mas também de ambiente favorável, para se manifestarem (YONAMINE e SILVA, 2002).

Conforme Jorde *et al.* (2004), estima-se que o genoma humano possua aproximadamente 25.000 genes diferentes. As alterações nesses genes ou em uma combinação deles é que podem produzir diversos distúrbios genéticos. Segundo Farah (1997), os distúrbios genéticos incluem:

- 1) Doenças monogênicas: são causadas pela alteração de um único par de genes. A mutação pode estar presente em apenas um alelo normal no cromossomo homólogo, e neste caso o indivíduo é heterozigoto (alelos não idênticos para determinado caráter), ou em ambos os alelos e neste caso o indivíduo é homozigoto (alelos idênticos para determinado caráter). São quatro padrões básicos de herança monogênica:

### 1.1.1 Herança autossômica dominante

O fenótipo aparece em todas as gerações e todo indivíduo afetado tem um genitor afetado.

Qualquer filho de genitor afetado tem risco de 50% de herdar o caráter.

Homens e Mulheres tem a mesma probabilidade de transmitir o fenótipo aos filhos de ambos os sexos.

Indivíduos normais gerados por um afetado não transmitem a anomalia.

Normalmente a prole é afetada pela união entre um homozigoto normal (aa) e um heterozigoto afetado (Aa).

### 1.1.2 Herança autossômica recessiva

O fenótipo se expressa apenas em homozigotos recessivos, isto é, tendo herdado um alelo mutante de cada genitor e pode ficar por várias gerações sem aparecer.

Os genitores de um afetado tem probabilidade de 25% de gerar outro filho afetado.

De um casal de afetados nascem apenas filhos afetados, enquanto que de casais constituídos de um afetado e outro normal nascem, em geral, indivíduos normais.

A anomalia afeta indivíduos de ambos os sexos na mesma proporção.

Normalmente, o pai e a mãe dos afetados quase nunca tem a anomalia e a proporção de casais consanguíneos entre os genitores de afetados é mais alta do que da população.

### 1.1.3 Herança dominante ligada ao X

Homens normais, casados com mulheres afetadas, poderão ter filhos e filhas normais e afetados em proporções iguais.

Homens afetados, casados com mulheres normais, não tem filhos afetados, mas todas as filhas são afetadas.

Normalmente, a frequência de mulheres afetadas é o dobro daquela de homens afetados.

### 1.1.4 Herança recessiva ligada ao X

O fenótipo aparece em todos os homens que apresentam o alelo, mas as mulheres só expressam o fenótipo se em homozigose recessiva.

O pai afetado nunca passa o gene para os filhos, mas passa para todas as filhas.

Homens afetados geralmente não tem filhos afetados. A presença de filhos afetados de pai afetado, somente ocorre quando a mulher é heterozigota (portadora do gene para a anomalia).

O gene pode transmitir-se por uma série de mulheres portadoras.

Normalmente, a incidência do caráter é muito mais alta em homens do que em mulheres, porém mulheres heterozigóticas geralmente não são afetadas, mas algumas expressam a afecção com intensidade variável.

Exemplos de algumas doenças monogênicas são: anemia falciforme, fibrose cística, doença de Batten, doença de Huntington, síndrome de Marfan, síndrome do X-Frágil, hemocromatose, deficiência de alfa-1 antitripsina, distrofia muscular de Duchenne, hemofilia A, fenilcetonúria, etc.

2) Doenças poligênicas ou multifatoriais: são causadas pela interação de vários genes e provêm de múltiplos fatores ambientais. Exemplos: hipertensão arterial, doença de Alzheimer, diabetes mellitus, vários tipos de câncer e obesidade.

3) Doenças cromossômicas: são causadas devido a alterações na estrutura do cromossomo, como perda cromossômica, aumento do número de cromossomos ou translocações cromossômicas e originadas devido a erros na divisão celular. Exemplos de algumas doenças cromossômicas são: síndrome de cri-du-chat (miado de gato); síndrome de deleção e duplicação do cromossomo 3; síndrome de Down; trissomia do 18; trissomia do 13; síndrome de Klinefelter; síndrome de Turner.

### **1.3 Deficiência Intelectual (DI)**

O termo deficiência intelectual tem sido objeto de controvérsia na literatura especializada. A definição da Organização Mundial de Saúde (CID-10, 1993) faz referência genérica a aspectos funcionais colocando-os como indicadores ou consequências do funcionamento intelectual rebaixado. Esse funcionamento é percebido como o núcleo da própria definição e do critério diagnóstico. Para se ter um diagnóstico definitivo, segundo a Classificação Internacional de Doenças, na sua 10ª revisão (CID-10, 1993), deve-se observar um nível reduzido de funcionamento

intelectual, o que resultará em capacidade diminuída para se adaptar às exigências diárias do contexto social normal (CARDOZO e SOARES, 2011).

O DSM-IV(2003), *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, muito embora destaque uma etiologia orgânica, adiciona critérios funcionais e psicométricos na caracterização da deficiência intelectual, enfatizando os aspectos funcionais, ao definir e especificar áreas de conduta adaptativa como parte dos critérios diagnósticos. Essa definição orienta na verificação do funcionamento intelectual significativamente inferior à média, dos déficits ou comprometimentos concomitantes ao funcionamento adaptativo em pelo menos duas das seguintes áreas: comunicação, cuidados pessoais, vida doméstica, habilidades sociais/interpessoais, uso de recursos da comunidade, independência, habilidades acadêmicas, trabalho, lazer, saúde e segurança. Além disso, para a caracterização da deficiência intelectual, é necessário o início anterior aos 18 anos.

Até pouco tempo atrás, tanto o termo deficiência mental quanto o termo retardo mental eram usados de modo intercambiável, quando então a *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (2010) escolheu deficiência intelectual como o preferível. A AAIDD (2010) vem liderando o campo de estudos sobre deficiência intelectual, definindo conceituações, classificações, modelos teóricos e orientações de intervenções em diferentes áreas. Embora secular e influenciando sistemas de classificação internacionalmente conhecidos como o DSM e a CID-10, a AAIDD não é conhecida no Brasil como são os outros dois sistemas. Esse fato talvez se deva à pouca divulgação de suas produções entre especialistas e pesquisadores brasileiros. O atual modelo proposto pela AAIDD traduz uma concepção multidimensional, funcional e bioecológica de deficiência intelectual, adicionando sucessivas inovações e reflexões teóricas e empíricas em relação aos seus modelos anteriores (CARDOZO e SOARES, 2011).

Luckasson *et al* (2002) apresenta a seguinte definição de deficiência intelectual: *incapacidade caracterizada por limitações significativas, tanto no funcionamento intelectual quanto no comportamento adaptativo e está expressa nas habilidades práticas, sociais e conceituais, originando-se antes dos 18 anos de idade*. Observa-se, nessa definição, que a deficiência intelectual não representa um atributo da pessoa, mas um estado particular de funcionamento.

Estima-se que 650 milhões de indivíduos no mundo todo tenham DI, a maioria deles residindo em países desenvolvidos, com idade pediátrica. De acordo

com um censo realizado pela Organização das Nações Unidas (ONU), cerca de 5% da população brasileira apresenta algum tipo de DI. A prevalência de DI no Brasil é elevada se comparada com a de outros países em desenvolvimento como o México, cuja prevalência recentemente relatada foi de 4,2/10.000 recém-nascidos com DI (KACHANI e CORDÁS, 2011).

A DI é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes. As crianças acometidas muitas vezes apresentam-se ao pediatra com queixa de atraso na fala/linguagem, alteração do comportamento, ou baixo rendimento escolar (VASCONCELOS *et al.*, 2004).

A DI divide-se em quatro níveis de gravidade, variando de leve a profunda. A adaptação à sociedade e a possibilidade de adquirir habilidades sociais e profissionais adequadas para um custeio mínimo das próprias despesas dependem do nível de gravidade do indivíduo, embora graus variados de supervisão, orientação e assistência sejam em geral necessário (ÁVILA, 2009).

Em pacientes com DI, a função intelectual está abaixo da média, demonstrado por um quociente intelectual (QI) igual ou menor que 70. Um QI normal é considerado acima de 85, e os indivíduos com um escore de 71 a 84 são descritos como tendo função intelectual limítrofe (*AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION*, 1994).

Os testes do QI são mais válidos e confiáveis em crianças maiores de 5 anos, e por isso muitos autores preferem termos alternativos, tais como atraso do desenvolvimento, dificuldade do aprendizado, transtorno do desenvolvimento ou deficiência do desenvolvimento. Além disso, como os testes do QI nem sempre estão disponíveis, há uma tendência natural a utilizar os termos atraso do desenvolvimento e DI como sinônimos, mas é preciso ter em mente que nem toda criança pequena com retardo na aquisição dos marcos do desenvolvimento terá DI quando testada formalmente em uma idade maior (VASCONCELOS, 2004).

As causas de DI podem ser genéticas ou ambientais, e congênitas (por exemplo, exposição fetal a teratógenos, distúrbios cromossômicos) ou adquiridas (por exemplo, infecção do sistema nervoso central, traumatismo craniano) (CARDOZO e SOARES, 2011). A DI pode, ainda, ser categorizada em sindrômica, isto é, a criança apresenta características dismórficas associadas que levam à identificação de uma síndrome genética, ou não-sindrômica. Convém mencionar que os recém-nascidos diagnosticados com defeitos estruturais congênitos tem uma

chance 27 vezes mais alta de receber o diagnóstico de DI aos 7 anos de idade (ÁVILA, 2009).

O mapeamento do genoma humano e a capacidade de desativar um determinado gene em animais de laboratório possibilitaram o estudo das alterações intracelulares específicas de cada mutação gênica e a correlação de uma molécula deficiente com o resultante déficit cognitivo, estabelecendo as bases celulares da cognição (RAMAKERS, 2002).

Os neurônios são as unidades condutoras de sinais do sistema nervoso e apresentam dois tipos de prolongamentos: vários dendritos curtos, que são arborizados e recebem os sinais de outros neurônios, e um único axônio longo, que transmite os sinais adiante. As espinhas dendríticas são elementos diminutos localizados em locais pós-sinápticos das sinapses excitatórias, como locais de contato entre axônios e dendritos, medeiam a plasticidade sináptica que fundamenta o aprendizado, a memória e a cognição (LUNDY-EKMAN, 2004).

Isto é, a remodelagem das sinapses e as alterações na forma e no número das espinhas dendríticas são a base anatômica do aprendizado e da memória. Ademais, diversas proteínas codificadas por genes cujas mutações produzem DI ligado ao cromossomo X executam as vias de sinalização que regulam a morfologia das espinhas dendríticas, a liberação de neurotransmissores, o crescimento dos axônios e o citoesqueleto de actina. A hipótese atual é a de que a DI origina-se de um defeito da estrutura e função das sinapses neuronais (VASCONCELOS, 2004).

O conceito de plasticidade abrange as capacidades do cérebro de ser moldado pela experiência, de aprender e recordar e de reorganizar-se e recuperar-se após uma lesão. A plasticidade se desenvolve a partir da interação das vias excitatórias e inibitórias atuantes nas sinapses, com um predomínio das primeiras, servidas pelo neurotransmissor glutamato (LUNDY-EKMAN, 2004). A ativação dos receptores glutamatérgicos leva à formação e estabilização das sinapses. Algumas proteínas intracelulares também estão implicadas, pois regulam o citoesqueleto de actina, o qual é crucial para o crescimento e a diferenciação dos neurônios (KANDEL, 2001). O aprendizado e a memória envolvem alterações a curto prazo na força ou eficácia da neurotransmissão nas sinapses, bem como alterações a longo prazo na estrutura e no número das sinapses. A transcrição de genes é a via comum final para o registro das memórias a longo prazo e para a construção de circuitos

neuroniais maduros no cérebro em desenvolvimento (CHRISTOFOLINE *et al.*, 2007).

Croen *et al.* (2001) avaliaram as características epidemiológicas da DI no Estado da Califórnia entre 1987 e 1994. Depois de excluir as crianças diagnosticadas com paralisia cerebral, autismo, anormalidades cromossômicas, infecções, distúrbios endócrinos ou metabólicos, traumatismos ou intoxicações, malformações cerebrais e doenças ou neoplasias do sistema nervoso central, os autores encontraram 11.114 crianças com DI de origem desconhecida. Constataram, então, que um peso ao nascer < 2.500 g foi o fator preditivo mais forte de DI, e encontraram outros fatores de risco associados à DI, tais como nível educacional inferior da mãe, idade maior da mãe ao nascimento da criança e múltiplos nascimentos.

A grande maioria das causas de DI não tem cura disponível, porém a definição da causa frequentemente ajuda a família a compreender o prognóstico e a estimar o risco de recorrência. A este respeito, um diagnóstico preciso é inestimável para o aconselhamento genético do paciente e da sua família, pois às vezes é possível antecipar futuros problemas médicos. Por exemplo, 21% das mulheres portadoras da pré-mutação da SXF apresentarão insuficiência ovariana prematura (FOP) (RITTEY, 2003).

O pediatra pode promover o bem-estar e a qualidade de vida das crianças acometida com DI, indicando programas de estimulação precoce, tratando os distúrbios associados e atuando como defensor dos direitos dos pacientes na comunidade (FINUCANE, 2003).

Por exemplo, quando o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade está associado à DI, o uso de metilfenidato pode melhorar a atenção e o comportamento das crianças, embora não melhore o aprendizado. Outro distúrbio comumente associado à DI é a epilepsia, e aqui deve-se dar atenção especial aos efeitos adversos cognitivos e comportamentais em potencial na escolha das drogas antiepilépticas. O pediatra também deve ter em mente que as crianças e os adolescentes com DI constituem um grupo de alto risco para maus-tratos infantis (GROSSMAN *et al.*, 2010).

As doenças que causam DI mais prevalentes são: síndrome de Down, síndrome do X-Frágil (SXF), síndrome do álcool fetal, intoxicação por chumbo, infecções congênitas, síndromes neurocutâneas, síndrome de Rett, malformações

cerebrais, erros inatos do metabolismo e desnutrição protéico-calórica (VASCONCELOS, 2004). Estimativas atuais demonstram a SXF como sendo a causa mais comum e mais pesquisada de DI herdável em seres humanos (KACHANI e CONDÁS, 2011).

## 1.4 Síndrome do X-Frágil (SXF)

### 1.4.1 História e Definição

Desde o final do século XIX observação intrigante despertou a curiosidade dos pesquisadores, um: a preponderância significativa de homens em instituições para pessoas com comprometimento intelectual. A frequência de homens, nessas instituições, chegava a ser 25% maior do que a de mulheres não sendo, na época, possível encontrar explicação plausível para esse fato (SHERMAN, 1991).

Em meados do século XX, na Inglaterra, J. Purdon Martin e Julia Bell (1943) descreveram uma família com 11 homens afetados por deficiência intelectual, em duas gerações e provenientes de mães intelectualmente normais. O heredograma da família era sugestivo de herança ligada ao cromossomo X. Subsequentemente, outras famílias com deficiência intelectual de herança ligada ao cromossomo X foram descritas e estes estudos levaram Lehrke (1972) postular a provável influência de genes localizados no cromossomo X sobre a inteligência humana. O cromossomo X deveria conter vários *loci* que, quando mutados, originariam várias síndromes de deficiência intelectual (QUEIROZ, 2007).

Em 1969, Lubs estudando os cromossomos dos indivíduos afetados de uma família na qual tanto a mãe como dois de seus filhos apresentavam comprometimento intelectual, observou uma falha peculiar próximo à extremidade distal do braço longo do cromossomo X. Algumas mulheres heterozigotas quanto ao gene da síndrome também apresentavam este cromossomo X com a falha, que foi denominada de cromossomo X marcador (REIS, 2006).

O cromossomo X marcador foi também observado em uma família brasileira, sendo esta a segunda descrição do marcador citogenético. Havia, assim, uma forma de deficiência intelectual de herança ligada ao X (CARVALHO, 2003).

Em 1981, Richards *et al.* estudaram os cromossomos dos indivíduos da família inicialmente descrita por Martin e Bell (1943) e detectaram o sítio frágil

característico no cromossomo X dos indivíduos afetados daquela família. Sugeriram que a síndrome, até então denominada de Martin-Bell, para identificar o quadro clínico associado ao cromossomo marcador passasse a ser chamada de Síndrome do X-Frágil (SXF), como é referida até hoje. A citogenética representou, portanto, importante marco das pesquisas laboratoriais relacionadas à SXF (QUEIROZ, 2007).

Do ponto de vista genético, a SXF é uma doença monogênica, de herança recessiva ligada ao X, que causa um distúrbio do neurodesenvolvimento, devido ao gene chamado *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*), localizado no Xq27.3, cuja região do promotor apresenta-se instável e susceptível à expansão de trinucleotídeos contidos nessa região (KUMARI e USDIN, 2010).

Na SXF, o X-Frágil refere-se a um marcador citogenético (FRAXA), chamado de sítio frágil folato sensível, no qual a cromatina não se condensa, caracterizando-se por uma constrição e tendência para quebras (Figura 1) (ZEIER *et al.*, 2009). O gene contido nesta região foi designado *FMR1* e contém 38 quilobases (kb) e 17 éxons (BIACSI *et al.*, 2008), sendo dele transcrito um mRNA de 4,8 Kb, que servirá de molde para a síntese da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (KHALIL *et al.*, 2008). O sequenciamento do gene revelou em humanos, um total de 185.775 pares de bases no gene *FMR1* (COLLINS *et al.*, 2010).

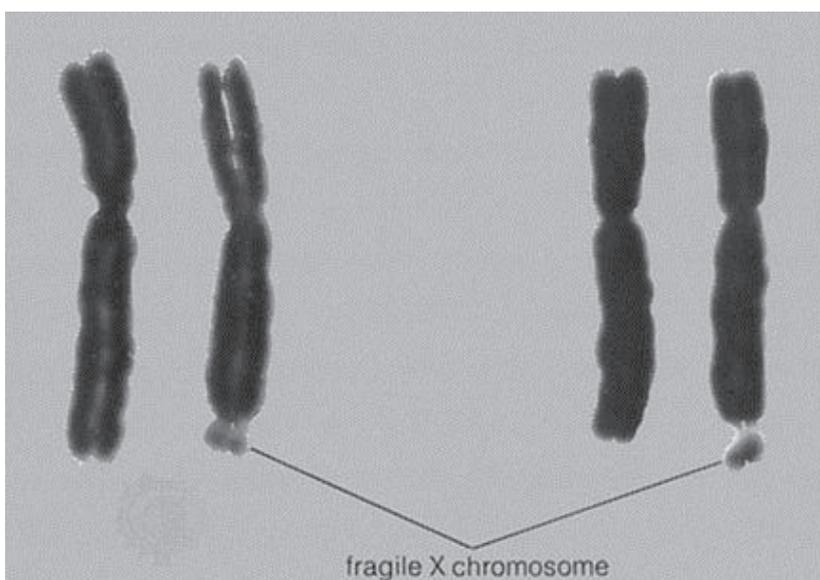


Figura 1: O cromossomo X com uma falha em seu braço longo - FRAXA(q27.3) - presente nos indivíduos afetados pela SXF.

Fonte: <http://fragilexsyndrome.blogspot.com/>.

O mecanismo que origina a mutação presente na SXF consiste na expansão repetida do número de cópias de uma sequência de bases CGG (citosina-guanina-

guanina) do DNA, que ocorre normalmente na porção inicial, na extremidade 5' do primeiro éxon, do gene FMR1 (RUEDA *et al.*, 2009).

A sequência de repetição que se encontra no promotor do gene é funcionalmente associada à transcrição do mRNA (KHALIL *et al.*, 2008). A expansão dos trinucleotídeos resulta na hipermetilação da região, impossibilitando a enzima RNA polimerase, necessária para a transcrição do mRNA, de se ligar à região promotora do gene, levando-o à instabilidade. Conseqüentemente, o mRNA não é produzido e o gene é silenciado, ocasionando assim, a falta do produto final, a proteína FMRP, indispensável para o desenvolvimento normal do sistema nervoso e de vários outros sistemas (YIM *et al.*, 2008).

A clonagem do gene FMR1 em 1991 propiciou o diagnóstico molecular acurado. Indivíduos afetados que apresentam acima de 200 repetições da sequência CGG, são chamados de portadores da mutação completa. Na população normal, o número de repetições CGG é polimórfico e varia de 6-50 unidades. Indivíduos, fenotipicamente normais, que apresentam repetições CGG entre 50-200 unidades são chamados de portadores da pré-mutação (COFEE *et al.*, 2009). A Figura 2, na página a seguir, mostra o número de repetições no promotor do gene, de acordo com as categorias relatadas acima.

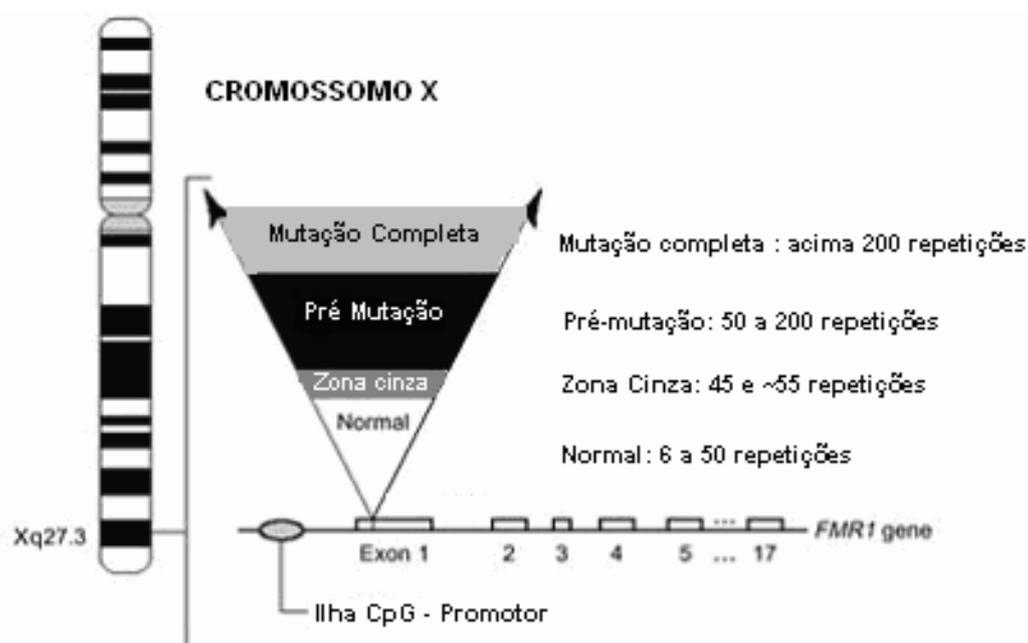


Figura 2: Cromossomo X e Gene FMR1 com número de repetições. Categorias: normal; zona cinza; pré-mutação e mutação completa.

Fonte: <http://spnl.stanford.edu/researchproj/fragilex.htm>.

Convém elucidar que um número de repetições CGG entre 45 e 55 pode ser estável em certas pessoas, mas em outras, apresentar tendências a se expandir quando o gene é transmitido para as gerações seguintes. Os genes com repetições CGG nessa faixa são considerados como fazendo parte de uma zona intermediária ou cinzenta (*gray zone*) (ARRIETA *et al.*, 2008).

Os pacientes, portadores da repetição compreendidos na zona cinza, desenvolvem deficiências como distúrbio de aprendizado e comportamento, apesar da mutação relacionada ao número de CGG estar próxima do normal (BECHARA *et al.*, 2009).

O sexo masculino é o mais afetado porque os homens são hemizigóticos para o cromossomo X e as mulheres tem a compensação do outro cromossomo X. Com isso, as mulheres portadoras do gene mutado apresentam sinais e sintomas mais brandos que variam conforme o grau de mutação ou pré-mutação em que se encontra o gene FMR1 (OOSTRA e WILLEMSSEN, 2009).

#### 1.4.2 Herança Genética

A SXF afeta homens e mulheres e tem suas peculiaridades de herança. A maioria da população tem no cromossomo X o gene FMR1 normal, entretanto, este também pode apresentar alterações, conforme observado na Figura 3 (SILVA, 2008).

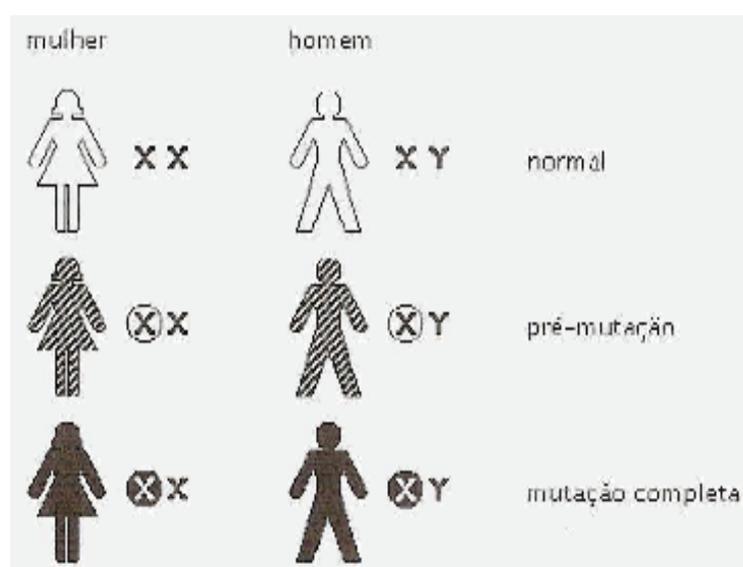


Figura 3. Formas alteradas de transmissão do FMR1. Homens e mulheres poderão ser normais, portadores da pré-mutação ou afetados pela mutação completa.

Fonte: Silva (2008).

A herança da SXF não segue os padrões mendelianos clássicos. As mutações encontradas fornecem uma explicação para a herança genética atípica observada para esta doença. O aspecto mais intrigante da SXF é sua penetrância incompleta tanto em homens quanto em mulheres portadores da expansão de trinucleotídeos. Isto se torna peculiar nos casos dos homens portadores, fenotipicamente normais, que transmitem a mutação para seus netos através de suas filhas, aparentemente não afetadas (DOBYNS *et al.*, 2004).

Sherman *et al.* (1985) chamou atenção para o fato de que a chance de ocorrerem afetados era menor na prole das avós portadoras do gene alterado do que entre as crianças de suas netas portadoras da expansão CGG maior. Portanto, com maiores chances de expandir para uma mutação completa.

Esse padrão de herança ficou conhecido na época como o “Paradoxo de Sherman”. Atualmente, está esclarecido esse aparente paradoxo: a pré-mutação nas gerações mais recentes tem uma repetição CGG maior e, portanto, uma maior chance de se expandir para uma mutação completa (OOSTRA e WILLEMSSEN, 2009).

Estudos de segregação indicam que o número de trinucleotídeos tende a aumentar a cada geração, durante a meiose feminina, na oogênese e na fase das mitoses pós-zigóticas (podendo gerar mosaicismos cromossômicos) (SOONTARAPORNCHAI *et al.*, 2008). A instabilidade em relação a replicação da sequência expandida explicaria as diferenças de penetrância do quadro clínico se a mutação foi herdada do pai ou da mãe, assintomáticos ou afetados. Quando transmitida pela mulher, o número de repetições de trinucleotídeos tende a aumentar de geração para geração, podendo continuar na categoria de pré-mutação ou transformar-se em mutação completa, caso não sofra interrupção por trincas que estabilizam a sequência como AGG, a cada 9 ou 10 trincas (QUEIROZ, 2006).

Logo, a frequência e localização dessas trincas interruptoras (AGG) influenciam na estabilidade do polimorfismo CGG do gene FMR1, que impede que essa região evolua, através de gerações, para a pré-mutação e para a mutação completa. Aparentemente haveria um limiar de 34-38 repetições CGG não interrompidas para a ocorrência de expansões meióticas (GRANT *et al.*, 2007).

Estudos acerca da herança do gene FMR1 nas famílias mostram que homens afetados, portadores da mutação completa, transmitem o cromossomo X com a mutação completa para suas filhas, porém, de modo inesperado e, ainda não

elucidado, o gene passado a elas, retorna o estado de mutação completa para pré-mutação. Portanto, todas as filhas de homens portadores tanto da pré-mutação, quanto da mutação completa, herdarão do pai a pré-mutação (SILVA, 2008).

A frequência da pré-mutação em FMR1, estimada em caucasianos, é de 1:259 em mulheres e 1:813 em homens. Dados empíricos mostraram que a transição da pré-mutação para mutação completa ocorre somente na meiose materna e depende tipicamente do tamanho da pré-mutação. Uma mulher com uma pré-mutação de 60 repetições de CGG tem um risco pequeno de ter uma criança afetada, ao passo que se a pré-mutação for de 90 ou mais repetições de CGG o risco relativo é de aproximadamente 100% (COFEE *et al.*, 2009).

Não ocorre expansão de pré-mutação à mutação completa na meiose masculina. Deste modo, as filhas de homens portadores de pré-mutação não são afetadas. Em função disto, os homens portadores de pré-mutação são denominados homens transmissores normais. Em contrapartida, a expansão mitótica da repetição de CGG é maior nos homens. Por este motivo, os filhos de mulheres transmissoras tem expansões muito maiores que as filhas (POUYA *et al.*, 2009).

#### 1.4.3 Gene FMR1

Dentre as 155 Mb que perfazem a sequência do cromossomo X humano (VAN ESH, 2006), o gene FMR1 ocupa 38 Kb. Esse gene é localizado na região Xq27.3 no cromossomo X (Figura 4), composto por 17 éxons e 16 introns, tem em seu primeiro e maior deles a sequência repetitiva do trinucleotídeo CGG, que apresenta em alelos normais um número variável de 6 a aproximadamente 50 cópias, com valor médio na população de 29 repetições (COLLINS *et al.*, 2010).

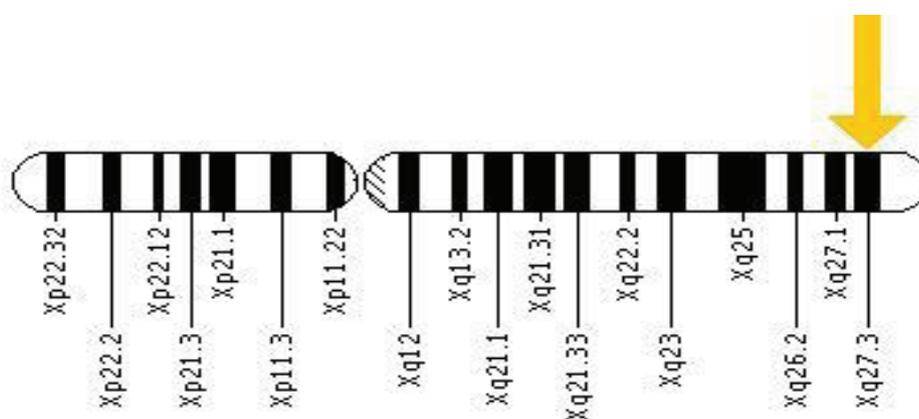


Figura 4: Ideograma do cromossomo X indicando o mapa físico do gene FMR1, localizado em Xq27.3.

Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FMR1>.

O gene FMR1, mostra-se altamente conservado do ponto de vista evolutivo e chega a apresentar 95% de homologia com o gene FMR1 encontrado em camundongos, o que torna este animal um bom modelo para estudar a SXF. O gene FMR1 codifica pelo menos 12 tipos de mRNA originados por meio de processamento alternativo do pré-mRNA (*splicing alternativo*) (OOSTRA e WILLEMSSEN, 2009).

O gene FMR1 se expressa forte e generalizadamente no início do desenvolvimento embrionário em camundongos. Porém, nos adultos a expressão é mais localizada, concentrando-se no cérebro (hipocampo e cerebelo) e túbulos seminíferos. Em tecidos humanos o padrão de expressão de FMR1 é semelhante ao observado em camundongos (QUEIROZ, 2007).

A mutação mais freqüente no gene FMR1 ocorre pela expansão de um trecho instável de repetições de trinucleotídeos CGG na extremidade 5' não traduzida do gene FMR1 (COLLINS *et al.*, 2010). A origem da instabilidade dos alelos de FMR1 ainda é questionável. É fato que quando um alelo apresenta entre 45 e 55 cópias CGG, a instabilidade gerada resulta em expansão da repetição. Estes constituem a segunda classe alélica, algumas vezes categorizados como protomutados, amplamente conhecidos como “zona de transição” (ARRIETA *et al.*, 2008).

A terceira classe é constituída de alelos com a expansão que variam entre 50 e 200 cópias CGG, denominados, em grupo, de pré-mutações. São estas pré-mutações, instáveis, que durante as meioses, principalmente, femininas originam a quarta classe alélica de FMR1, chamada de mutação completa. Quando as expansões apresentam mais de 200 cópias da repetição, ocorre metilação das ilhas CpG adjacentes. A metilação resulta no bloqueio das bases citosina por grupos metila, impedindo a transcrição e, conseqüentemente a inativação do gene, a proteína FMRP não é produzida (Figura 5) (QUEIROZ, 2007).

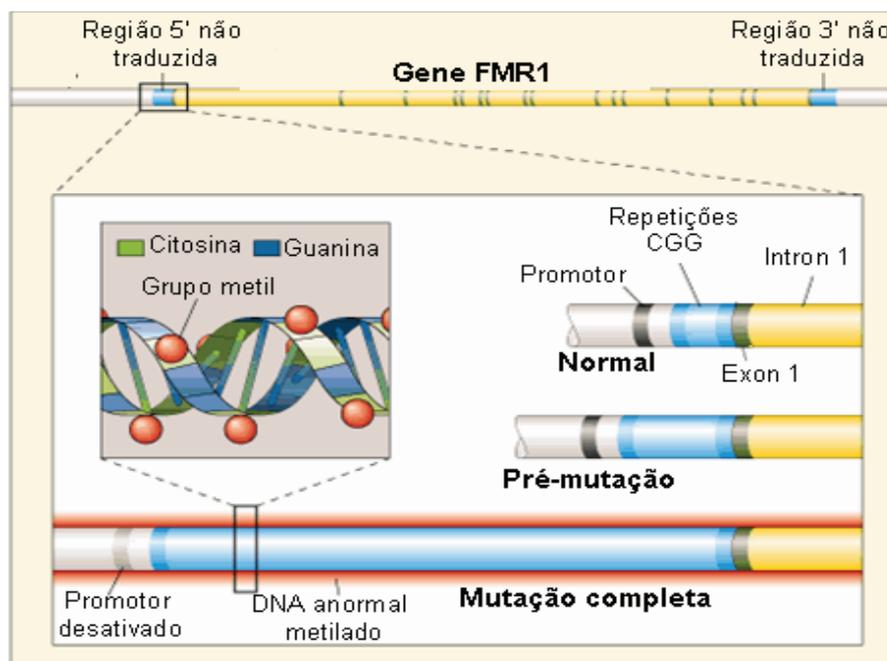


Figura 5: Gene FMR1 no estado normal, pré-mutado e mutado completamente.  
Fonte: Queiroz (2007).

As mutações completas são mitoticamente instáveis, determinando a ocorrência de mosaïcismo, que significa que há presença no mesmo indivíduo de uma mutação completa e de uma pré-mutação, sendo estabelecido precocemente, durante a embriogênese. Posteriormente as expansões CGG se estabilizam e se transmitem de maneira clonal (ARRIETA *et al.*, 2008).

O mosaïcismo é mais frequente entre as mulheres. Nesse caso, as células que apresentam a pré-mutação continuam produzindo a proteína FMRP e as células que apresentam a mutação completa não, pois o gene encontra-se silenciado. Os indivíduos mosaicos apresentarão menor severidade dos sintomas associados às mutações completas (HANSON e MADISON, 2007).

Existem dois tipos de mosaïcismo na SXF, o mosaïcismo mutacional que ocorre em cerca de 20% dos indivíduos afetados que apresentam a mutação completa em co-ocorrência com outra linhagem celular, que contém o alelo pré-mutado do gene FMR1 não metilado e funcional (TASSONI e HAGERMAN, 2003). Mais rara é a ocorrência de uma linhagem normal em conjunto com outra linhagem celular com a pré-mutação ou a mutação completa no gene FMR1. Nestes casos a diferença pode aparecer no mesmo tecido, ou em tecidos diferentes (BIACSI *et al.*, 2008).

O segundo tipo, o mosaïcismo de metilação, ocorre em casos onde o número de cópias é característico da mutação completa, mas o DNA não está metilado em todas as células. O mosaïcismo de metilação pode ser encontrado em

indivíduos com o número de repetições CGG no limite inferior da faixa de mutação completa (TASSONI e HAGERMAN, 2003).

Em indivíduos com o alelo da mutação completa do gene FMR1 observa-se um padrão variável de metilação. Cada padrão de metilação representa um epigenótipo, e a variabilidade dos epigenótipos celulares de cada indivíduo é incomum, sugerindo que os padrões de metilação, tanto em indivíduos normais como em afetados são dinâmicos (ZEIER *et al.*, 2009). Em indivíduos com o alelo da mutação completa, a presença de um número variável de células onde não ocorre a metilação garante a expressão gênica em variados graus, influenciando o fenótipo (HANSON e MADISON, 2007).

O promotor do gene FMR1 encontra-se numa ilha CpG, de cerca de 1Kb. A transcrição é iniciada em três locais diferentes ao longo do promotor. Observando o sentido 5'-3', os sítios III, II e I, anteriores à repetição CGG, são utilizados tanto em alelos normais quanto naqueles onde há pré-mutação, mas em proporções diferentes. Quanto maior a repetição, há o predomínio de utilização nos sítios iniciadores mais distais à repetição, indicando que a seleção de local de iniciação é influenciada pelo elemento CGG (BEILINA *et al.*, 2004).

Nas repetições CGG são encontradas sequências intercalantes de trincas AGG (adenina, guanina, guanina) a cada 9 ou 10 repetições (TABOLACCI *et al.*, 2008). Essas sequências AGG interrompem as sequências CGG e inferem na estabilidade do alelo. A população apresenta um número médio normalmente de 30 repetições com duas interrupções de AGG. O desenvolvimento da SXF a partir da instabilidade das repetições CGG pode ocorrer devido à perda dessas sequências intercalantes (FERNANDEZ-CARVAJAL *et al.*, 2009).

A perda das inclusões AGG parece representar um evento mutacional importante na geração de alelos de FMR1 instáveis que, conseqüentemente, são passíveis de expansão (TABOLACCI *et al.*, 2008). Observações posteriores sugerem que a perda das interrupções AGG não seja o evento inicial que confere instabilidade. É mais provável que este evento seja a última barreira antes da hiperexpansão (KUMARI e USDIN, 2010).

O gene FMR1 apresenta dois parálogos autossômicos: FXR1 e FXR2 mapeados em 12q13 e 17p13.1, respectivamente. Os indivíduos com a SXF que tem déficit ou ausência da proteína FMRP apresentam níveis normais das proteínas

codificadas pelos genes FXR1 e FXR2. Além de interagirem entre si, as três proteínas interagem com ribossomos no processo de síntese protéica (COFEE *et al.*, 2009).

Considerando a significativa homologia presente entre os genes FXR1 e FXR2, a falta destas proteínas deve resultar em efeitos fenotípicos similares. Teoricamente é possível que indivíduos com o fenótipo da SXF que apresentam o alelo normal do gene FMR1 bem como níveis normais da proteína FMRP possam ter anormalidades no gene FXR1 ou FXR2 (RODRIGUEIRO, 2006).

O gene FMR1 apresenta também ortólogos altamente conservados em *Mus musculus*, *Galus galus*, *Drosophyla* sp. Estudos sobre a expressão destes genes em modelos animais tem contribuído para o entendimento das funções da proteína correspondente e suas interações na célula (HANSON e MADISON, 2007).

#### 1.4.4 Proteína FMRP

O transcrito gerado pelo gene FMR1 é da ordem de 4.4 Kb. O processamento do mesmo apresenta alternativas em 5 pontos diferentes, o que deve contribuir para sua diversidade funcional (GOLDLER *et al.*, 2010).

A proteína FMRP, de 70-80 kD, encontrada predominantemente no citoplasma está presente em todos os neurônios de indivíduos normais estudados (RODRIGUEIRO, 2006).

A FMRP contém dois tipos de motivos ligadores de RNA, dois domínios KH (homólogos a proteína K) e um box do tipo arg-gli-gli. A sua localização é citoplasmática podendo estar associado a mRNAs, e/ou fazendo parte de grandes complexos de ribonucleoproteína (RNPs) e polirribossomos (GROSS *et al.*, 2010).

A sequência de FMRP sugere sua função. Sinais de localização e de exportação nucleares (NLS e NES) e domínios de homologia K (KH1 e KH2) sugerem que a proteína FMRP deva transitar dentro e fora do núcleo celular além de possuir atividades relacionadas a RNAs diversos, predizendo sobre o fenótipo pleiotrópico da SXF (COFEE *et al.*, 2009).

Em linhagens celulares humanas, a FMRP encontra-se associada a polirribossomos e ao retículo endoplasmático rugoso. Há fortes evidências na literatura que suportam a idéia de ser a proteína FMRP importante na tradução de diversos mRNAs. Experimentos *in vitro* mostram que FMRP funciona como agente repressor de tradução de seu próprio mRNA (CRUZ-MARTIN *et al.*, 2010).

Foi demonstrado em estudos que as repetições CGG a 5' do loco FMR1 são os sítios de ligação de uma proteína nuclear denominada *BP-1*, que também é capaz de se ligar *in vitro* a repetições CGG sintéticas. Quando as repetições CGG estão metiladas, outro complexo protéico se liga à região, indicando que o silenciamento do gene FMR1 deve resultar da interação entre vários fatores protéicos que influenciam a transcrição (BECHARA *et al.*, 2009).

A capacidade da FMRP ligar-se ao seu próprio e a outros mRNAs, através dos motivos da proteína, é devida à presença de uma estrutura, na fita simples de alguns mRNAs, conhecida como quartetos G ou tétrades G: guaninas que se ligam por pontes de hidrogênio formando um quadrado. Como aproximadamente 4% do total de mRNAs do cérebro de fetos humanos tem esse tipo de estrutura, é possível que a FMRP interaja com um grande número de mRNAs (TAN *et al.*, 2009).

Mais significativamente, FMRP aumenta tradução da superóxido mRNA dismutase quando ele interage com a estrutura. Estes achados sugerem que a ausência de FMRP pode resultar em redução dos níveis de superóxido dismutase, que por sua vez leva ao aumento do estresse oxidativo no cérebro. Curiosamente, estresse oxidativo no cérebro está relacionado à ansiedade, dificuldade para dormir, e autismo, que normalmente afetam os indivíduos com a SXF (RIFE *et al.*, 2003).

A função da FMRP nos neurônios funciona da seguinte maneira: a FMRP é dimerizada no citoplasma e entra no núcleo através do seu sinal de localização nuclear. A proteína é reunida em complexos de ribonucleoproteína (mRNP) e pode interagir com transcritos de RNA e outras proteínas. Posteriormente, o complexo FMRP-mRNP é transportado para fora do núcleo através do sinal de exportação de FMRP. Alternativamente, FMRP pode se ligar ao mRNA e se associar com mRNP no citoplasma. Uma vez no citoplasma, o complexo FMRP-mRNP pode se associar com ribossomos no corpo celular para produzir proteínas, algumas das quais são importantes para a orientação do axônio. Além disto, o complexo FMRP-mRNP pode se transportar para os dendritos e regular a síntese de proteína local de mRNAs específicos em resposta à estimulação sináptica, tais como a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato (SILVA, 2008).

#### 1.4.5 Características clínicas da SXF

As características fenotípicas da SXF são sutis e tardias, por isso de pouco valor diagnóstico nas crianças. As características comportamentais e o déficit cognitivo são as manifestações mais constantes e precoces na SXF (COLLINS *et al.*, 2010). O comprometimento cognitivo está sempre presente nos pacientes do sexo masculino com SXF. Entretanto, apresenta expressões muito variadas, desde dificuldades específicas, que levam a uma dificuldade no rendimento escolar (3,6% dos casos), até deficiência intelectual profunda (HALL *et al.*, 2009).

Apesar de não existir 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, realizar o rastreamento dos possíveis portadores da SXF (QUEIROZ, 2007).

O fenótipo comportamental na SXF inclui um razoável número de características, no que tange a cognição, linguagem e aspectos sociais, bem como problemas de conduta e alterações psicopatológicas (DOLEN *et al.*, 2007).

O atraso no desenvolvimento neuropsicomotor com o reconhecimento associado mais frequentemente à deficiência intelectual é a característica mais significativa na SXF (BHOGAL e JONGENS, 2010).

Para o indivíduo afetado, representa um bloqueio que limita as capacidades de aprendizado, a habilidade de auto-expressão, liberdade de movimentos e realização de tarefas. Para a sociedade, representa uma inabilidade caracterizada por redução de produtividade, uma certa dependência e vulnerabilidade à discriminação e exploração. Para a Saúde Pública é uma anormalidade comum, distribuída por todos os estratos da população e que impõe responsabilidades e custos vitalícios. Para a Medicina e para a Biologia, a deficiência intelectual é uma anormalidade na formação e/ou função do sistema nervoso central que demanda avaliação e explicação (RODRIGUEIRO, 2006).

A SXF contribui para 30% dos casos de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X (NOLIN *et al.*, 2008). Em homens afetados pela SXF, os valores de QI encontram-se em duas categorias. Até os 20 anos de idade apresentam uma média de QI igual a 50, enquanto indivíduos mais velhos exibem o valor médio de 35. Tais resultados são por vezes interpretados como um reflexo do declínio do QI com a idade (BRUN-GASCA, 2004). Por outro lado, a possibilidade

de tal diferença ser reflexo de intervenção deve ser considerada, uma vez que pacientes mais jovens são menos frequentemente institucionalizados, e devem então representar uma classe mais funcional (CHONCHAIYA *et al.*, 2009).

Em mulheres portadoras da SXF há uma menor prevalência de deficiência intelectual, estando a ampla maioria dessas mulheres nas categorias de inteligência limítrofe e de deficiência intelectual moderada (BRUN-GASCA, 2004). A inativação de um dos dois alelos de cada gene do cromossomo X que ocorre no início do período embrionário nas meninas gera duas populações celulares (HAGERMAN *et al.*, 2010). Este mecanismo genético é responsável pela ampla variabilidade do fenótipo das doenças recessivas ligadas ao X nas meninas heterozigóticas, uma vez que a inativação do alelo mutante se dá em proporções aleatórias. No caso da SXF, as meninas portadoras da mutação tendem a apresentar manifestações clínicas mais leves (JOHNSON, 2008).

Além da deficiência intelectual, outras características intelectuais bastante consistentes foram identificadas nos indivíduos afetados pela SXF, como por exemplo: abstração, fala repetitiva e fora do contexto e ecolalia (BOURGEOIS *et al.*, 2009).

Em diversos países foram realizados estudos em muitas famílias com afetados pela SXF, que demonstraram a presença de algumas características físicas, como a hiperextensibilidade das articulações (73-80%), prolapso da válvula mitral (55-60%), estrabismo (50-55%) e problemas ortopédicos (50%) (ZEIER *et al.*, 2009).

As características físicas comumente associadas à SXF apresentam variações conforme o grau de mutação ou pré-mutação, e na maioria das vezes as pessoas com a SXF, submetidas ao exame clínico, nem sempre são reconhecidas por essas características, sobretudo quando os sinais se manifestam de forma muito sutil (BARDONI *et al.*, 2006).

Considerando a extensa variabilidade individual das características físicas na SXF, um caso específico poderá apresentar poucos ou vários sinais, mas que nem sempre serão diagnosticados pelo exame clínico. Não é difícil encontrar entre a população afetada com SXF, uma pessoa identificada como tendo traços fisionômicos ditos "normais" (QUEIROZ, 2007).

A Tabela 2 contém as características comportamentais mais comuns identificadas nas crianças com SXF. Porém os sinais e sintomas não são de modo algum obrigatórios, sendo necessário que criança ou adulto com suspeita da SXF, tenham seu caso submetido a uma análise particular, a um exame físico detalhado e o teste genético para a observação da expansão de trinucleotídeos patognomônica, para essa condição genética (SILVA, 2008).

Tabela 2: Características Comportamentais da SXF.

Descrição			
Bom humor.	Ansiedade social.	Baixa tolerância à frustração.	Evita contato visual tátil.
Hiperatividade.	Recusa ao pedido de interação social.	Irritação e explosões emocionais.	Timidez.
Impulsividade.	Atitudes de aproximação e retirada.	Comportamento repetitivo.	Déficit de atenção.
Concentração reduzida.	Dificuldades de adaptação.	Facilidade para imitação.	Ansiedade.
Dificuldade em lidar com estímulos sensoriais.	Desagrado com alterações da rotina.	Hábito de agitar as mãos.	Baixa auto-estima.
Impaciência ou agressões em situações estimulantes.	Desconforto diante de imprevistos.	Hábito de morder as mãos.	Dificuldade no relacionamento social.

Fonte: Silva (2008).

Estudos mostraram que 28% de crianças e 15% de adultos com SXF apresentam os sintomas característicos do autismo, como: pobre contato visual, agitar ou morder as mãos e os problemas de interação social, que sugerem dificuldade de relacionamento e, como consequência, afastamento e solidão (HAGERMAN *et al.*, 2010).

Entretanto, ao contrário das pessoas com autismo, que evitam todo o tipo de contato visual, as pessoas com SXF tem efetivo interesse pela realidade, são sensíveis às expressões faciais e apenas evitam o contato direto olho a olho (HALL *et al.*, 2010). Na década de 80, algumas investigações registraram 5% de casos de meninos com SXF e autismo e, posteriormente, diversos autores confirmaram que 2% a 6% dos meninos com autismo tem SXF, e aproximadamente 30% dos meninos com SXF tem autismo (GARCIA-NONELL *et al.*, 2006).

Nas mulheres portadoras da pré-mutação na SXF as características mais marcantes estão mais associadas a distúrbios emocionais, como: ansiedade, variação no humor, pré-disposição à depressão, ansiedade e timidez (FERRANDO LUCAS *et al.*, 2004).

Estudos recentes verificaram a presença de Falha Ovariana Precoce (FOP) que produz a menopausa precoce em mulheres portadoras da pré-mutação. A FOP é uma patologia clínica na qual os ovários deixam de funcionar antes dos 40 anos. Em geral, a média de idade da menopausa está situada entre os 45 e 55 anos, e das mulheres com a FOP se dá entre 35 e 45 anos (CHONCHAIYA *et al.*, 2009).

Outras alterações observadas em pacientes portadores da SXF são alterações anatômicas no tamanho do cerebelo e nas ramificações dos dendritos. Convulsões foram verificadas em 15 a 20% das pessoas afetadas (GROSSMAN *et al.*, 2010).

Os principais sintomas associados à pré-mutação em FMR1 são ataxias e tremores. A este quadro clínico foi dado o nome de Síndrome de Ataxia e Tremor associada ao X-Frágil (FXTAS) (RODRIGUEZ-REVERENGA *et al.*, 2010). A FXTAS é uma doença neurodegenerativa, causa graves tremores progressivos e problemas de equilíbrio, como manifestações de instabilidade no andar, deficiência no uso de talheres, entre outros objetos (GARCIA-ARROCENA e HAGERMAN, 2010).

O fenótipo da FXTAS foi primeiramente identificado em 2001, quando foram descritos cinco homens, que apresentaram tremor iniciando entre os 50 e os 60 anos de idade, e que eram portadores da pré-mutação do gene FMR1 com 78 a 98 repetições CGG (REIS, 2006).

Estudos posteriores nos Estados Unidos, Holanda e Austrália registraram a ocorrência da FXTAS em 20% a 30% dos homens com pré-mutação. A FXTAS não tem cura, porém o diagnóstico pode ajudar a proporcionar tratamento farmacológico e a inclusão de outras terapias adequadas à condição dos pacientes (GARCIA-ARROCENA e HAGERMAN, 2010).

#### 1.4.6 Diagnóstico da SXF

O diagnóstico de um paciente com a SXF estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e portadores, e de

realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos (RUIZ *et al.*, 2009).

O primeiro método laboratorial para o diagnóstico foi descrito por Lubs, em 1969, que observou um sítio frágil na região Xq27-28 em amostras cultivadas em ácido fólico. Depois disso, várias regiões de sítios frágeis foram descritas na mesma região cromossômica, e foram denominados como FRAXA, FRAXD, FRAXE e FRAXF. FRAXA é o mais comum desses sítios e está associada com mutações no gene FMR1, responsável pela SXF, enquanto os demais sítios podem estar relacionados com outros genes, como por exemplo o gene FMR2 (STEINER *et al.*, 2005).

Com o advento de um marcador cromossômico presente em alguns casos de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X, a natureza sindrômica da doença tornou-se aparente. Uma vez que as condições de cultura para a caracterização do cromossomo X-frágil foram estabelecidas, a citogenética se tornou a ferramenta primária de diagnóstico da SXF (LUO *et al.*, 2009).

O conhecimento corrente da genética molecular da SXF deixou mais compreensível a variabilidade de expressão do sítio frágil, uma vez que as mutações divergem em uma mesma família. A avaliação molecular do gene FMR1, eficaz e indúbia, tornou-se o padrão “ouro” para o diagnóstico apropriado da SXF (STEINER *et al.*, 2005).

Vários centros de pesquisa trabalhavam já no início da década de 1980 através de estudos de clonagem posicional em prol da identificação do gene responsável pela SXF. Novos marcadores foram identificados nas vizinhanças do loco Xq27.3. Dentre elas, a sonda St14 definindo uma sequência repetitiva de número variável no loco DXS52 que é até hoje um dos melhores marcadores genéticos na banda Xq28 (RODRIGUEIRO, 2006).

O mapeamento físico da região empregou um grande número de pontos de quebra no cromossomo X em Xq27 e Xq28. Estes pontos de quebra usados para posicionar marcadores de DNA entre si permitiram a geração de marcadores adicionais com a finalidade de estabelecer a localização genética da SXF nesta região (LUO *et al.*, 2009).

Três contribuições em particular levaram ao isolamento do sítio frágil e do gene FMR1: o isolamento do cromossomo contendo a quebra no sítio frágil; a produção de grandes insertos de DNA derivados da região; e o estabelecimento de

grandes fragmentos de restrição cujos tamanhos estavam especificamente alterados em homens portadores da SXF, devido a metilação (RODRIGUEIRO, 2006).

Os híbridos de células somáticas que retinham o cromossomo X-Frágil foram originalmente importantes no estabelecimento da independência de outros fatores autossômicos no aparecimento do sítio frágil e levaram à consequente produção de um painel de linhagens celulares híbridas (WARREN *et al.*, 2001).

Uma vez que marcadores foram identificados na região, definidos pelos painéis de linhagens celulares híbridas bem como através dos mapas genéticos, a eletroforese em campo pulsado foi a ferramenta utilizada por vários grupos para gerar mapas da região. Dentre tantos trabalhos, um achado significativo foi o do consórcio américo-holandês que utilizou sondas derivadas de cromossomos artificiais de levedura (VERKERK *et al.*, 1991).

São raros (<1%) os casos em que a síndrome decorre de deleção total ou parcial, de mosaicismo ou de mutação de ponto no *loci* FMR1, indicando que existe heterogeneidade genética na origem da SXF, ou seja, pode haver SXF do ponto de vista clínico não associada ao cromossomo X-Frágil (BOY *et al.*, 2001). No entanto, mais de 99% das mutações de FMR1 são expansões de uma sequência repetida (CGG)<sub>n</sub>. Logo, o fato dos indivíduos afetados possuírem, em sua grande maioria, um único tipo de mutação (expansão de trincas CGG), facilita sobremaneira o diagnóstico e contrasta com o que ocorre em outras doenças hereditárias, como é o caso da fibrose cística, por exemplo, onde cerca de 1000 mutações diferentes foram relatadas (QUEIROZ, 2007).

Os diagnósticos clínicos indicam um conjunto de sinais e sintomas sugestivos. Entretanto, não podem confirmar o diagnóstico da SXF. Assim, é necessário realizar uma investigação molecular (LUO *et al.*, 2009).

Portanto, os indivíduos que apresentam deficiência intelectual de causas desconhecidas ou autismo, hiperatividade, déficit cognitivo, características físicas ou de comportamento relacionadas a SXF, ou ainda, uma história familiar de SXF, ou que tenham sinais sugestivos do quadro clínico da doença, devem se submeter fundamentalmente, ao teste genético molecular para definir o número de cópias CGG contido no promotor do gene FMR1 (FLORENCIA *et al.*, 2006).

Adicionalmente, os diagnósticos disponíveis para a SXF incluem a análise cromossômica ou cariótipo, testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica, que

fornece a porcentagem de proteína FMRP nas células e os diagnósticos moleculares por PCR, *Southern Blotting* e MLPA (YIM *et al.*, 2008).

#### 1.4.6.1 Métodos Moleculares

##### 1.4.6.1.1 *Southern Blotting*

*Southern Blotting* (SB) é o método utilizado para identificar a mutação completa e a pré-mutação, revelando o estado de metilação do gene. O diagnóstico pela técnica de SB é confiável para pacientes do sexo feminino e masculino e permite visualizar de forma direta o tamanho das sequências repetitivas, tanto em indivíduos normais, como em pré-mutados. Entretanto, o SB não permite determinar de forma precisa sequências repetitivas de tamanho pequeno, que são importantes quando necessitamos distinguir as sequências normais das pré-mutadas (ROSALES-REYNOSO *et al.*, 2009).

Para a análise por *Southern blotting*, o DNA a ser estudado é digerido utilizando-se enzimas de restrição. No diagnóstico da SXF são usadas a *EcoRI* e a *EagI*. A *EcoRI* permite verificar a variação de tamanho de um fragmento de restrição que apresenta cerca de 5,2 kb de comprimento em indivíduos normais. A *EagI* é sensível a metilação, ou seja, não é capaz de reconhecer seu sítio de corte se esta sequência estiver metilada (CARVALHO, 2003).

Portanto, permite verificar se esse mesmo fragmento, que contém a ilha CpG, está metilado ou não. Dentro do fragmento de 5,2 kb originado com a digestão pela *EcoRI*, a 5' das repetições CGG, existe um sítio de reconhecimento da *EagI*. Se o sítio de reconhecimento pela enzima estiver metilado, ela não reconhece e não corta, resultando na detecção do fragmento grande, resultante da digestão pela *EcoRI*, se o sítio de reconhecimento não estiver metilado, a enzima reconhece e corta resultando num fragmento menor, de cerca de 2,8 kb nos homens normais e no cromossomo X ativo normal das mulheres (CARVALHO, 2003).

Entre os milhões de fragmentos de DNA produzidos, existirão alguns contendo a sequência do gene FMR1 com a repetição de CGG. Os fragmentos que apresentarem metilação serão de longas repetições, podendo facilmente ser

distinguidos dos fragmentos desmetilados, que serão menores, isto é, com o número de repetições dentro da normalidade.

Em seguida, todos esses fragmentos de DNA serão colocados no gel e separados por tamanho com o uso de corrente elétrica (eletroforese) (NOLIN *et al.*, 2008).

Feito isso, segue-se à metodologia do *Southern Blotting*, e os fragmentos de DNA serão transferidos para uma membrana (*blotting*) de nylon ou nitrocelulose tratada com uma sonda hibridizadora. A sonda usada para hibridar com a região de expansão é chamada de StB12.3. A exposição da membrana ao filme de raios X produzirá linhas (chamadas "bandas") que servirão para análise do DNA. Mediante esta análise, o estado de metilação do gene FMR1 é definido, o que permite a caracterização de todas as classes de indivíduos relacionados com a SXF (BIACSI *et al.*, 2001).

É necessário que seja aplicada a combinação das técnicas PCR e SB para os casos estudados de SXF, especialmente, quando uma técnica ou outra tenha sido realizada individualmente e não tenha apresentado um resultado conclusivo (ÁVILA, 2009).

A combinação das duas técnicas permitirá a determinação do número exato de repetições CGG e também o padrão de metilação da região promotora do gene. O uso combinado das duas metodologias permitirá determinar com segurança superior a 99% quem é portador da pré-mutação do gene FMR1 e quem possui a mutação completa (BEILINA *et al.*, 2004).

#### 1.4.6.1.2 PCR

A técnica da PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction* = reação da polimerase em cadeia) é um método *in vitro* que a partir de uma quantidade mínima de DNA, permite a amplificação de sequências específicas, podendo ser considerada uma técnica de clonagem genética. A análise do gene FMR1 pela PCR consiste na amplificação de milhares de cópias de pedaços do gene FMR1 que contém as repetições CGG (QUEIROZ, 2006). A PCR é extremamente importante porque sua precisão permite identificar as repetições que já estão expandidas, e que caracterizam a pré-mutação, pois estas, tem o risco de aumentar nas gerações futuras, expandindo-se em mutação completa, e conseqüentemente, causar todos os

sintomas relacionados à SXF. O método de diagnóstico pela PCR alia simplicidade e especificidade. Entretanto, trata-se de um teste bastante sensível de análise e, portanto, é necessário muito cuidado na realização dos trabalhos para evitar contaminações cruzadas e inviabilizar o resultado (FILIPOVIC-SADIC *et al.*, 2010).

Para a execução do exame é necessário apenas o uso de pequenas quantidades de DNA, que podem ser obtidas por amostras de sangue, de esfregaço bucal, de fio de cabelo, ou pela amniocentese. Neste último caso, as amostras do líquido amniótico deverão ser coletadas entre a 15<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> semanas (QUEIROZ, 2006).

Para a reação da PCR é preparada uma mistura padrão (conhecida como mix), que contém, a amostra de DNA que será estudada, quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) que são as bases nitrogenadas, um par de oligonucleotídeos iniciadores, que devem ser complementares às sequências flanqueadoras à região de DNA de interesse e a enzima *Taq* DNA Polimerase em uma solução tampão, contendo magnésio (ROSALES-REYNOSO *et al.*, 2009).

O mix é colocado no termociclador, que fará ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos. A primeira etapa da reação da PCR é o aquecimento para desnaturação da dupla fita de DNA, seguida da ligação dos iniciadores (anelamento) nos locais complementares específicos e da extensão do DNA pela enzima. Cada uma dessas séries, desnaturação, anelamento e extensão, que ocorrem em diferentes temperaturas correspondem a um ciclo (FILIPOVIC-SADIC *et al.*, 2010).

As sequências de DNA de interesse são produzidas exponencialmente, pois os produtos formados a cada ciclo são utilizados pelos iniciadores na produção de novas sequências do DNA alvo no ciclo seguinte. Normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos para cada reação e milhares de cópias da sequência CGG são produzidas. Considerando-se o diagnóstico específico para a SXF, após a amplificação dos produtos, estes são separados por eletroforese em gel de agarose, e revelados por coloração de brometo de etídio. Em seguida, os tamanhos dos fragmentos podem ser visualizados e analisados (CARVALHO, 2003).

As mutações completas tem grandes repetições CGG e são muito difíceis de serem amplificadas, pois os fragmentos produzidos pela PCR, conhecidos como produtos da PCR, geralmente são mais curtos, variando num máximo de 100 a 120 repetições CGG (AHN *et al.*, 2007). Assim, na análise por PCR em homens, a

ausência de amplificação sugere a mutação completa, e o resultado precisa ser confirmado por Southern blotting (LUO *et al.*, 2009).

As mulheres normais podem apresentar um ou dois pedaços amplificados, dependendo de as repetições CGG em seus dois cromossomos X serem iguais ou não. Assim, nas mulheres com a suspeita de mutação completa, a análise *Southern blotting* é essencial, pois na PCR elas terão um único fragmento amplificado, o que pode ser confundido com o resultado obtido em pessoas sem mutação (FILIPOVIC-SADIC *et al.*, 2010).

#### 1.4.6.1.3 MLPA

Entre as técnicas mais promissoras para identificação das alterações relacionadas com a deficiência intelectual, está a *Multiplex Ligationdependent Probe Amplification* (MLPA). A técnica de MLPA foi desenvolvida e descrita por Schouten *et al.*, (2002) e permite detectar alterações no número de cópias em até 50 sequências diferentes de DNA em uma única reação de amplificação. Em outras palavras, essa técnica possibilita a identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente (UEHARA, 2010).

A identificação do número de cópias de uma dada sequência é efetuada por meio da hibridação de sondas específicas a essa sequência. A peculiaridade desta técnica está no fato de que não é o DNA genômico que é o alvo da amplificação por PCR, mas sim as sondas que se hibridam ao DNA é que são amplificadas. As sondas de MLPA constituem-se de dois oligonucleotídeos complementares às sequências alvo de DNA genômico: um oligonucleotídeo sintético curto e um oligonucleotídeo sintético longo (SUEMASU, 2010).

Suemasu (2010) descreve a técnica como sendo simples, em que uma amostra de DNA genômico é hibridizada com uma mistura de sondas, com amplificação posterior dos produtos de ligação por PCR, utilizando-se um par de *primers* universal. Os fragmentos finais são, então, separados e analisados em aparelho de eletroforese capilar, sendo possível a quantificação relativa de cópias gênicas. São basicamente 5 fases: Desnaturação do DNA, Hibridização das sondas, Reação de Ligação, Reação de PCR e Separação dos *amplicons* por eletroforese capilar. Nas duas primeiras fases, o DNA genômico é desnaturado, e então hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica à região a ser estudada).

Cada sonda comercial é formada por dois oligonucleotídeos, que se anelam de forma adjacente ao DNA, e são construídos da seguinte maneira:

**Sonda Esquerda:** oligonucleotídeo sintético curto, constituído por uma sequência homóloga ao *primer universal sense* (que contém marcador fluorescente) (em azul, Figura 6), seguido por uma sequência específica ao alvo com tamanho variável de 21 a 30 bases (nt) (em vermelho, Figura 6).

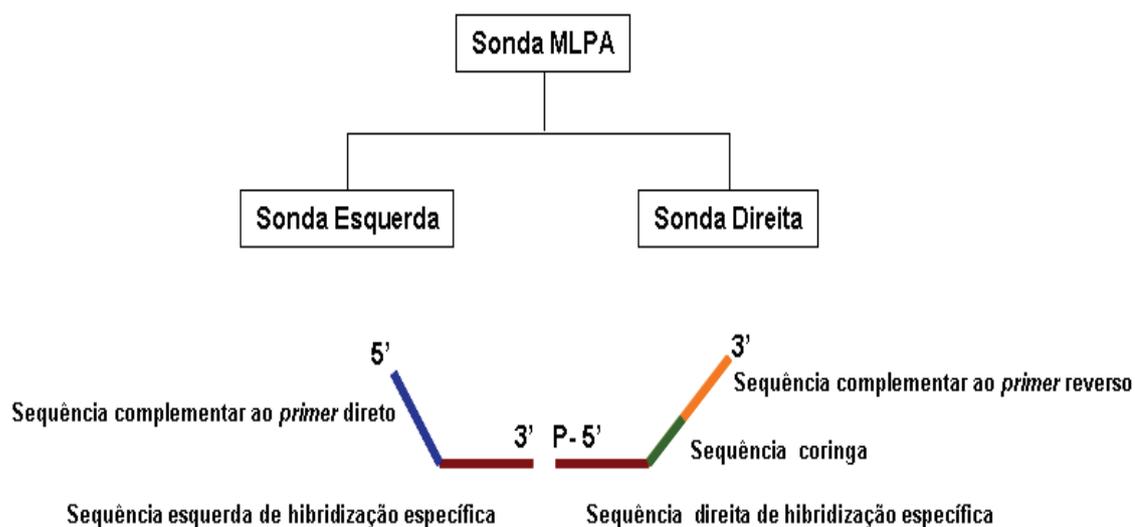


Figura 6: Representação esquemática das sondas comerciais de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas, a esquerda e a direita, que se anelam de maneira adjacente.

Fonte: Suemasu (2010).

**Sonda Direita:** oligonucleotídeo longo, derivado de fago M13, que contém uma sequência, específica ao alvo, de 25 a 43 nt (em vermelho, Figura 6), seguida por uma sequência coringa (com extensão diferente para cada sonda, 19 a 370 nt, o que definirá o tamanho a partir do qual o fragmento final poderá ser diferenciado dos demais - em verde, Figura 6) e, por fim, ainda uma sequência homóloga ao *primer universal antisense* (em laranja, Figura 6).

Em alguns casos, as sondas comerciais podem não ser suficientes para caracterizar o tamanho real das alterações e nestes casos, é possível sintetizar oligonucleotídeos sintéticos. Estruturalmente, as sondas sintéticas são semelhantes às comerciais, contudo não contam com a sequência coringa. Além disso, a sonda direita é também sintética, não sendo derivada de fago M13, como no caso da sonda comercial.

Uma vez hibridizadas aos seus respectivos alvos, as sondas de MLPA terão seus componentes (sonda esquerda e direita) ligados uns aos outros por uma enzima ligase dependente de temperatura, formando um fragmento único (Fase de Ligação), com a seguinte disposição: 5' fluoróforo (de coloração azul) – região de ligação ao *primer* universal *sense* – sequência complementar ao DNA alvo – sequência coringa (apenas na sonda comercial) – região de ligação ao *primer* universal *antisense* 3'.

Após a ligação, inicia-se a fase de amplificação, no qual os fragmentos formados pelas duas sondas, agora unidas, são amplificados por PCR, empregando-se um único par de *primers* universais que se anelam às sequências situadas nas duas extremidades dos produtos de ligação.

Em seguida, os *amplicons* são separados por eletroforese capilar e podem ser analisados em relação aos controles sem alteração, a partir de programa ou software específico de genotipagem. Dados de área e altura de pico de cada produto de amplificação podem ser utilizados na normalização e refletem o número relativo de cópias de cada sequência-alvo, permitindo a identificação de deleções e/ou duplicações. Um resumo dos procedimentos adotados nas reações de MLPA encontra-se disposto na Figura 7.

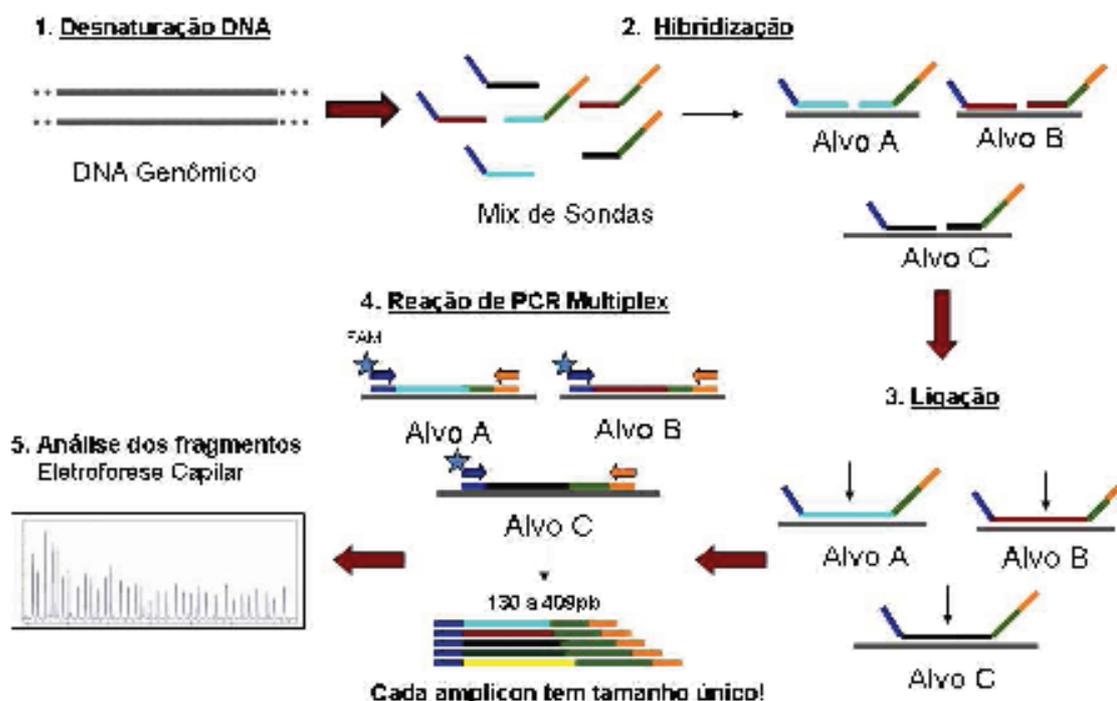


Figura 7: Representação esquemática do procedimento adotado nas reações de MLPA.

Fonte: Suemasu (2010).

As indicações dessa técnica são muitas, podendo ser aplicada com sucesso em um número de genes em que a ocorrência de deleções e duplicações é comum e que não estão acessíveis às demais técnicas moleculares (FUNARI, 2010).

A técnica de MLPA possui ainda aplicações além da quantificação do número de cópias: também é possível quantificar a expressão gênica, detectar metilação e identificar mutações de ponto. No entanto, ela tem sido empregada principalmente nos estudos que visam detectar alterações no número de cópias (SHEN e WU, 2009).

Segundo o fabricante dos *kits*, a técnica de MLPA possui algumas vantagens em relação a outras já utilizadas para a detecção de alterações genômicas, entre as quais se destacam a detecção de mais de 50 sequências de DNA genômico em uma mesma reação, utilizando somente 20 ng de DNA humano (rendimento alto); necessidade de apenas um termociclador e um sistema de eletroforese capilar para a realização da técnica, que disponibiliza os resultados em 24 horas (praticidade alta e rapidez); possibilidade de inclusão de muitas amostras em um mesmo ensaio (reprodutibilidade); capacidade de detectar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo; protocolo único para muitas aplicações diferentes (CARVALHO, 2009).

A análise pela técnica de MLPA é uma alternativa apropriada para contornar as situações quando existem patologias onde o gene (ou parte dele) se encontra deletado ou duplicado, as técnicas laboratoriais de PCR e sequenciamento apresentam limitações na detecção devido à amplificação exclusiva do alelo normal na amostra ou da amplificação simultânea de vários alelos (SHEN e WU, 2009) (Figura 8).

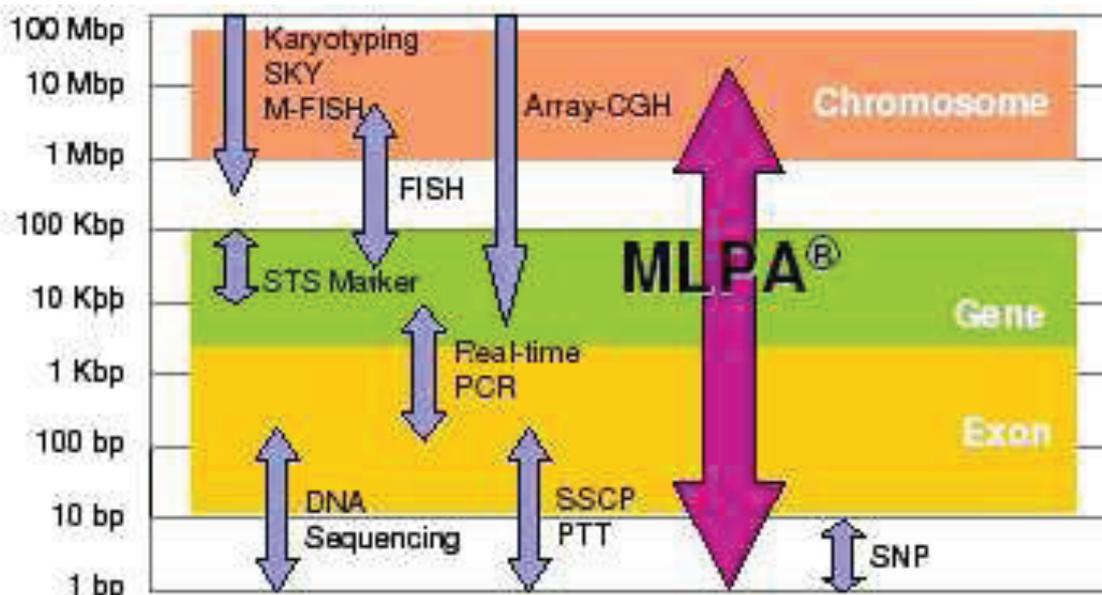


Figura 8: MLPA comparado às outras técnicas.

Fonte: Suemasu (2010).

#### 1.4.7 Aconselhamento Genético

A SXF tem caráter hereditário e o resultado positivo terá implicações que poderão envolver outros membros da família, portanto, será necessária uma investigação minuciosa para identificar os indivíduos que possivelmente herdaram o gene FMR1 alterado, pois o mesmo poderá levar às mutações que causam todos os sintomas da SXF (HESSL *et al.*, 2005).

É importantíssimo que o aconselhamento genético inicie tão logo seja estabelecido o diagnóstico definitivo, pois o profissional envolvido (aconselhador genético), além de comunicar ao paciente e a família sobre a realidade do quadro clínico de sua doença, a partir de uma ampla investigação de todos os fatos genéticos envolvidos (Kim, 2005); contribuirá também de forma fundamental com as informações sobre a transmissão da SXF, auxiliando decisivamente um casal a planejar seu futuro, de forma a prevenir a recorrência da síndrome na família (BARDONI *et al.*, 2006).

O aconselhador genético redirecionará terapias avançadas, tornando-as mais específicas e compatíveis com as peculiaridades da doença, e conseqüentemente, influenciará de forma eficiente o tratamento e as estratégias de intervenção. É importante reafirmar que quanto mais cedo for iniciado o aconselhamento genético, maior será a probabilidade de se melhorarem os

resultados no futuro, e finalmente, revelar-se-á de crucial importância para as gerações atuais e futuras de uma família (OOSTRA e WILLEMSSEN, 2010).

Muitas famílias poderão se beneficiar com o diagnóstico definitivo, acompanhado de aconselhamento genético, pois terminará com um período de enormes incertezas, marcará o fim de uma peregrinação desgastante, ouvindo opiniões pouco convincentes, e principalmente, libertando-as de recomendações contraditórias (BRUNONI, 2002).

A avaliação e análise estabelecidas no aconselhamento genético, além de fornecer apoio familiar que poderá ajudar a criança no desenvolvimento de suas aptidões cognitivas e na redução da severidade dos problemas de comportamento, poderão também, apresentar contribuições significativas para o entendimento das características da SXF de modo geral, podendo levar, inclusive, à descoberta de novas formas de tratamento, e conseqüentemente a possíveis mediações de intervenções biológicas (KIM, 2005). As intervenções de especialistas capacitados para trabalharem com a síndrome, contribuem significativamente para minimizar os problemas ocasionados e para auxiliar as pessoas com SXF a desenvolverem o máximo de suas potencialidades (SILVA, 2008).

Atualmente, o tratamento é orientado no sentido de tratar os sintomas, pois, melhorando os sintomas, indiscutivelmente, melhora-se a qualidade de vida das pessoas afetadas. Tratamentos medicamentosos, educacional e ocupacional estão sendo realizados com bastante êxito e, comprovadamente, tem beneficiado as pessoas no convívio familiar, escolar e social. Não há um tratamento medicamentoso específico para a SXF. Entretanto, muitas são as estratégias para aliviar os problemas comportamentais e emocionais, a exemplo de hiperatividade, mudanças de humor agressividade, impulsividade, ansiedade, crises obsessivas, depressão, déficit emocional, entre outros (BARBATO, 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Validar o diagnóstico genético-molecular da Síndrome do X-Frágil (SXF), no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, pela técnica de MLPA.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o MLPA como método de triagem de pacientes com suspeita da Síndrome do X-Frágil (SXF);
- Contribuir no atendimento à população, proporcionando um diagnóstico genético a indivíduos com suspeita de SXF.

### 3 CAPÍTULO 1 – ESTUDO DE CASO

#### AVALIAÇÃO DA MLPA NA TRIAGEM DE PACIENTES COM SUSPEITA DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL: A EXPERIÊNCIA DE GOIÂNIA NO SUS

STEGANI, F.C.<sup>1-2</sup>; SILVA, D.M.<sup>1</sup> DA CRUZ, A, D<sup>1</sup>, MELO, C,A,O<sup>1</sup>, AMANCIO, A,P<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Goiânia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

<sup>2</sup> Curso de Fisioterapia. Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

#### 1 Introdução

A síndrome do X frágil (SXF) é a forma mais frequente, mais pesquisada e melhor documentada de deficiência intelectual (DI) herdável em seres humanos. Estimativas atuais baseadas em revisão de diagnósticos citogenéticos, utilizando métodos de análise molecular, demonstram uma prevalência de 1 em 4000 homens e 1 em 6000 mulheres. É considerada a principal causa hereditária e a segunda etiologia genética de DI, sendo, nessa situação, somente superada pela Síndrome de Down (LAMONICA *et al.*, 2011).

Do ponto de vista genético, a SXF é uma doença monogênica, de herança recessiva ligada ao X, de caráter semi-dominante, caracterizada por 30% a 60% de penetrância nas mulheres e 80% a 100% nos homens. A SXF é resultante de um distúrbio do neurodesenvolvimento, devido ao silenciamento do gene FMR1 (*Fragile Mental Retardation Type 1*), localizado no cromossomo X. A região do promotor do FMR1 apresenta-se instável e susceptível à expansão de trinucleotídeos (CGG) contidos na região 5' não-traduzida do gene FMR1 (VAN ESCH, 2006).

Indivíduos normais tem aproximadamente 6-50 repetições e os indivíduos considerados portadores de pré-mutação tem 50-200 repetições. Acima de 200 cópias da repetição ocorre a mutação completa com consequente inativação do gene e ausência de seu produto protéico, a FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (YIM *et al.*, 2008).

As características fenotípicas da SXF são sutis e tardias, sendo as alterações comportamentais e o déficit cognitivo, principalmente a deficiência intelectual (DI), as manifestações mais constantes e precoces (COLLINS *et al.*, 2010).

Entre as técnicas mais promissoras para a identificação dessas alterações, está a *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification* (MLPA) (SUEMASU, 2010)

que é um método sensível, rápido e simples, visando a quantificação relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações de ponto conhecidas (CARVALHO, 2009).

Assim, o objetivo do presente estudo foi validar o diagnóstico genético-molecular da SXF no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, utilizando a técnica de MLPA.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Casuística**

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de pesquisas Replicon/BIO/PUC Goiás e no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, na cidade de Goiânia. O estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-SGC/PUC Goiás), parecer nº 0039.0.168.000-19, aprovado em 15/09/2010 (Anexo 3). Os pacientes ou seus responsáveis legais foram informados a respeito da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)(Anexo 2). Foram selecionados 33 pacientes que procuraram o LaGene para diagnóstico genético com indicação clínica para a SXF no período de setembro de 2010 à julho de 2011, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Pacientes encaminhados ao LaGene para diagnóstico genético, de setembro de 2010 a julho de 2011, com indicação clínica da SXF.

<b>Código</b>	<b>Idade anos</b>	<b>Etnia</b>	<b>Sexo</b>
1	13	Negróide	M
2	6	Parda	F
3	8	Parda	M
4	3	Parda	M
5	9	Parda	M
6	27	Caucasóide	M
7	4	Parda	M
8	9	Parda	M
9	3	Parda	F
10	11	Parda	M
11	3	Parda	M
12	7	Parda	M
13	3	Caucasóide	F
14	15	Parda	M
15	9	Parda	M
16	15	Parda	M
17	6	Negróide	M
18	14s	Caucasóide	M
19	4	Caucasóide	M
20	6	Parda	F
21	19	Caucasóide	M
22	15	Parda	M
23	10	Negróide	M
24	8		M
25	8	Caucasóide	M
26	11	Caucasóide	M
27	14	Caucasóide	M
28	3	Parda	M
29	8	Caucasóide	M
30	7	Parda	M
31	9	Caucasóide	M
32	9	Parda	F
33	18	Caucasóide	M

\* ADNPM: Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

## 2.2 Extração e Quantificação das Amostras

As amostras biológicas de todos os pacientes foram obtidas a partir da coleta de 5,0 mL de sangue periférico, em EDTA. Para a extração de DNA, foi utilizado o Kit *Purelink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação da concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) de cada amostra foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro *Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer* (*Picodrop Limited, UK*), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

## 2.3 Reações de MLPA

Para realização da análise por MLPA foi utilizado o *Salsa MLPA Kit P106-B1 MRX*, que detecta alterações no número de cópias de vários genes do cromossomo X. O Kit incluiu sondas para 14 dos 19 genes do retardo mental ligado ao cromossomo X (RMX) (Anexo 1). Foram utilizados 50 ng de DNA genômico por paciente. Os tubos foram colocados em um termociclador e iniciou-se o programa de termociclagem para a reação de MLPA, indicado na Tabela 4. A reação de MLPA envolve basicamente cinco (5) etapas, conforme demonstrado na tabela abaixo, desnaturação, hibridização, ligação, desnaturação cíclica e extensão final.

Tabela 4: Protocolo de termociclagem utilizado para a realização das reações de MLPA.

Estágios	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação	98	05	01
Pausa	25	--	--
Hibridização	95	01	01
Pausa	60	01	--
	54	Pausa	--
	54	15	01
Ligação	98	05	01
	15	Pausa	--
Pausa	60	--	--
Desnaturação cíclica	95	60 s.	35
Anelamento	60	30 s.	--
Extensão cíclica	72	60 s.	--
Extensão final	72	20	01
Repouso	15	--	--

## 2.4. Análise dos dados

O Kit SALSA MLPA foi projetado para detectar deleções e/ou duplicações de um ou mais éxons dos genes do MRX. No caso dos pacientes com suspeita da SXF, apesar da expansão dos trinucleotídeos próximos à região promotora dos genes FMR1 e FMR2, não ser detectada pelas sondas do kit, a presença de expansões acarretaria uma redução da área máxima relativa, como consequência, poderá ser visualizada uma diminuição dos picos obtidos, nos gráficos de análise.

Nesse contexto, os produtos amplificados de cada paciente foram identificados e analisados por eletroforese capilar, com o auxílio do equipamento ABI 3130 e aplicação do software de análise Coffalyser, versão 9.4 (Citogem, EUA). Primeiramente, os picos foram normalizados e os resultados obtidos foram de aproximadamente 1 para os picos selvagens, 0,5 para deleções heterozigotas e 1,5 para duplicações heterozigotas. Os resultados foram plotados em planilhas do Excel, para cada paciente analisado.

### 3 Resultados

A capacidade do método de MLPA para se diagnosticar pacientes com a síndrome do X-frágil foi avaliada para 33 pacientes, os quais foram encaminhados ao LaGene, por médicos da rede pública do município de Goiânia-GO. Todos os pacientes apresentaram cariótipos com bandas G normais, não sendo detectadas aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais. O método de MLPA foi validado pelo uso de amostras de DNA de 10 indivíduos, sendo 3 do sexo feminino e 7 do sexo masculino, sem indicação clínica de deficiência intelectual. Como controle da reação, foi utilizada a amostra de 1 paciente do sexo masculino, que não apresentava a SXF.

Foram utilizadas 47 sondas referentes às regiões do cromossomo X, associadas à deficiência intelectual (Tabela 5). O kit SALSA MLPA P106-B1 MRX é utilizado para se detectar alterações nos números de cópias de 16 genes distintos, tais como os genes RPS6KA3, ARX, IL1RAPL1, TSPAN7, PQBP1, HUWE1, OPHN1, ACSL4, PAK3, DCX, AGTR2, ARHGEF6, FMR1, AFF2 (FMR2), SLC6A8 e GDI1. Para a maioria desses genes, as sondas são capazes de se hibridar a mais de um éxon (Tabela 5).

Tabela 5. Genes do cromossomo X analisados com SALSA P106-B1 em pacientes com DI e suspeita clínica de SXF.

Gene detectado	Comprimento (nt)	Posição no cromossomo X	Fenótipo associado a mutações no gene
ACSL4 exon 12	148		
ACSL4 exon 17	190	Xq22.3	Síndrome de Alport
ACSL4 exon 1	247		
AFF2 exon 1	154		
AFF2 exon 5	241	Xq28	RM*, falha ovariana precoce e TOC**
AFF2 exon 20	261		
AFF2 exon 3	283		
AGTR2 exon 1	130		
AGTR2 exon 3	355	Xq24	RMNS***
ARHGEF6 exon 1	346		
ARHGEF6 exon 4	445	Xq26.3	RMNS***
ARHGEF6 exon 9	172		
ARHGEF6 exon 19	202		
ARX exon 2	196		
ARX exon 4	220	Xp21.3	Espasmos infantis severos e RM*
ARX exon 1	229		
DCX exon 5	215		
DCX exon 6	275	Xq23	Lissencefalia
DCX exon 3	319		
FMR1 exon 16	142		
FMR1 exon 9	166	Xq27.3	SXF****
GDI1 exon 1	136		
GDI1 exon 7	378	Xq28	RMNS***
HUWE1 exon 61	184		
HUWE1 exon 6	254	Xp11.22	RM*
IL1RAPL1 exon 3	234		
IL1RAPL1 exon 1	292	Xp21.3	RMNS***
IL1RAPL1 exon 6	427		
IL1 RAPL1 exon 2	328		
OPHN1 exon 1	373		
OPHN1 exon 3	409	Xq12	RMLXS***** com epilepsia
OPHN1 exon 12	436		
OPHN1 exon 21	472		
PAK3 exon 7	385		
PAK3 exon 21	400	Xq22.3	RMNS***
PAK3 exon 14	418		
PAK3 exon 22	481		
PQBP1 exon 2b	310		
PQBP1 exon 5	391	Xp11.23	RM
RPS6KA3 exon 21	178		
RPS6KA3 exon 3	364	Xp22.12	Síndrome de Coffin-Lowry
RPS6KA3 exon 1	454		
SLC6A8 exon 4	208		
SLC6A8 exon 9	301	Xq28	RM
TSPAN7 exon 1	160		
TSPAN7 exon 5	268	Xp11.4	RM

RM\*: Retardo mental/ \*\*TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo/ \*\* RMNS: Retardo Mental não síndrômico/\*\*\*\* Síndrome do X-frágil/ \*\*\*\*\* RMLXS: Retardo mental ligado ao X.

### 3.1 Amplificação das sondas

As ampliações foram obtidas para amostras biológicas de 5 pacientes (15%), sendo 1 do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Os resultados obtidos para cada paciente foram comparados com o controle positivo (Figura 9), no qual houve amplificação das 47 sondas referentes às regiões do cromossomo X, associadas à deficiência intelectual, conforme descrito anteriormente.

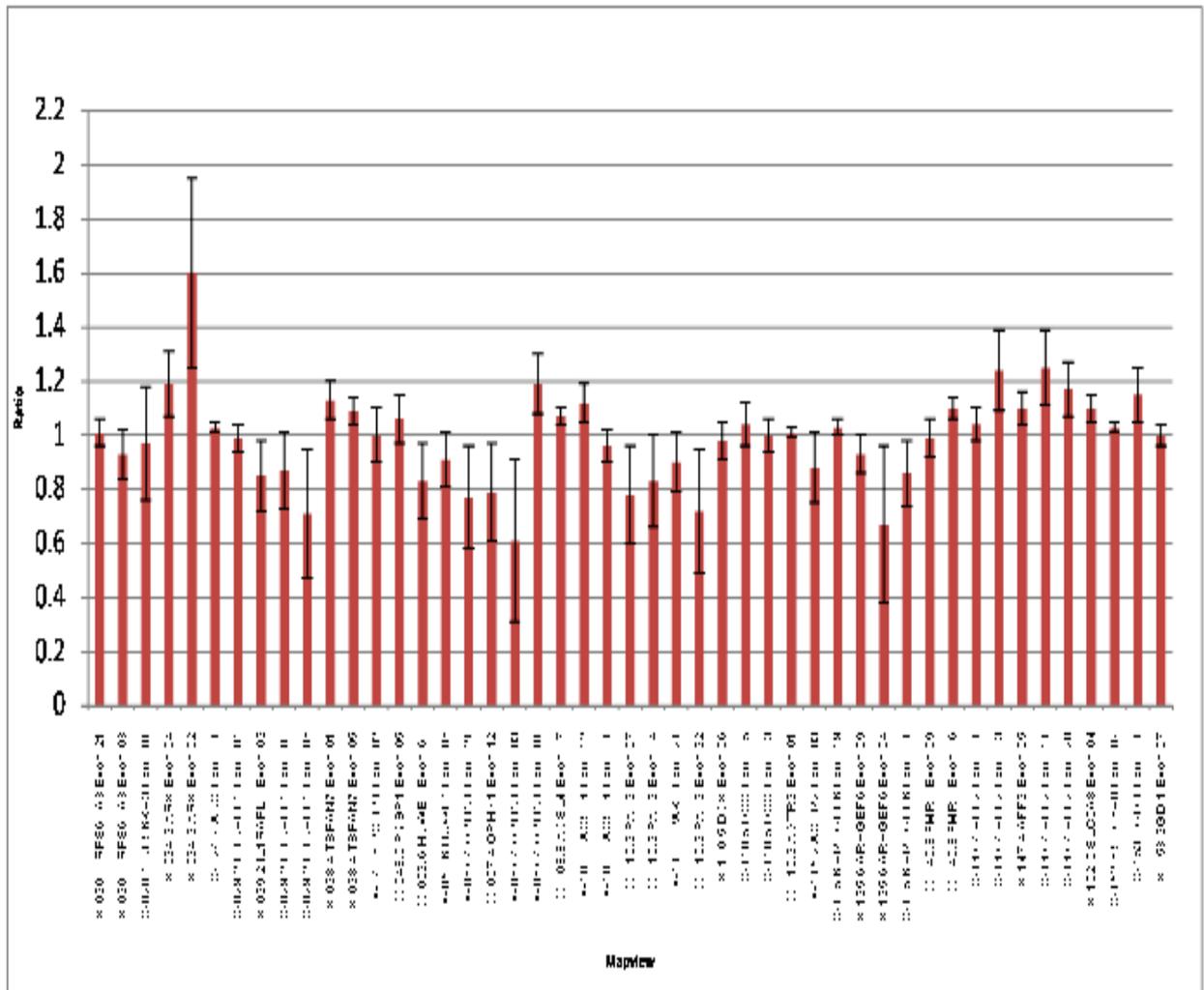


Figura 9: Resultado da amplificação das 47 sondas do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX para o controle negativo masculino.

### 3.2 Análises dos pacientes

#### Paciente 1

Paciente 1, do sexo masculino, com 6 anos, etnia negróide, residente e procedente de Goiânia, foi atendido no Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Goiás (UFG). Faz uso de ritalina e apresenta atraso no desenvolvimento

neuropsicomotor (ADNPM). Para esse paciente, houve amplificação de 39 sondas. As regiões referentes ao éxon 1 do gene RPS6KA3, éxons 3 e 21 do gene OPHN1, éxons 7, 14, 21 e 22 do gene PAK3 e o éxon 4 do gene ARHGEF6 não amplificaram, após a realização de três corridas sucessivas (Figura 10).

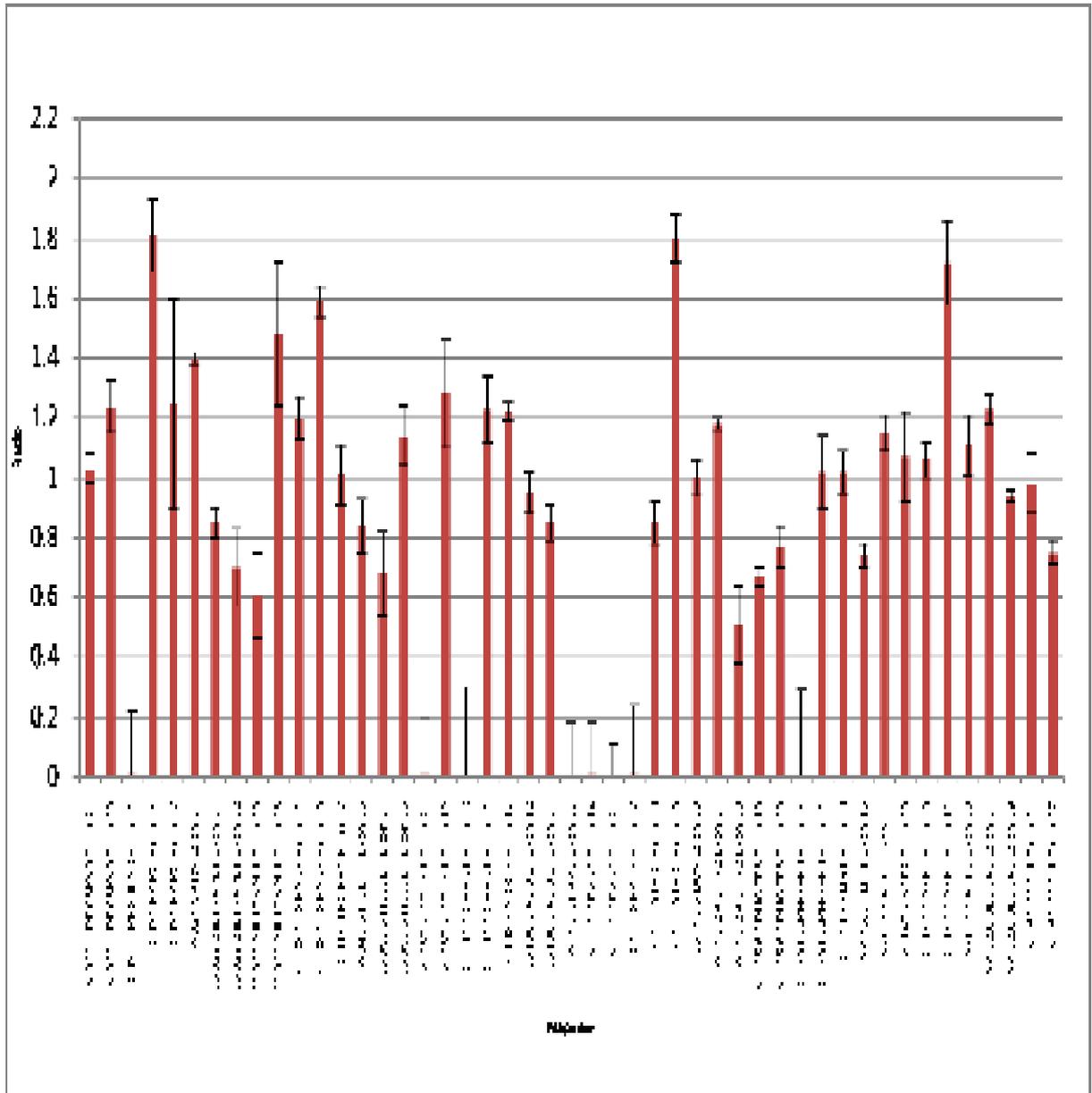


Figura 10: Resultado da amplificação de 39 sondas do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX para o paciente 1.

Após as análises, não foram detectadas alterações no gene FMR1, para o paciente 1. No entanto, o paciente apresentou ganhos no éxon 6 do gene RAPL1 e no éxon 5 do gene DCX. Após a normalização dos picos, nenhum ganho foi confirmado.

### Paciente 2

Paciente 2 do sexo masculino, 12 anos, etnia caucasóide, residente e procedente de Itumbiara, interior do Estado de Goiás. Foi encaminhado ao LaGene/Replicon pelo Hospital das Clínicas, da UFG, apresentando um importante atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

Para esse paciente, houve a amplificação de 39 sondas. Os éxons 1 do gene RPS6KA3, o 6 do gene RAPL1, o 5 do gene PQBP1, o 3 e o 21 do gene OPHN1, o 14 e o 22 do gene PAK3 e o éxon 4 do gene ARHGEF6 não foram amplificados. Após a normalização dos picos, não foram detectadas alterações no número de cópias nas regiões amplificadas (Figura 11).

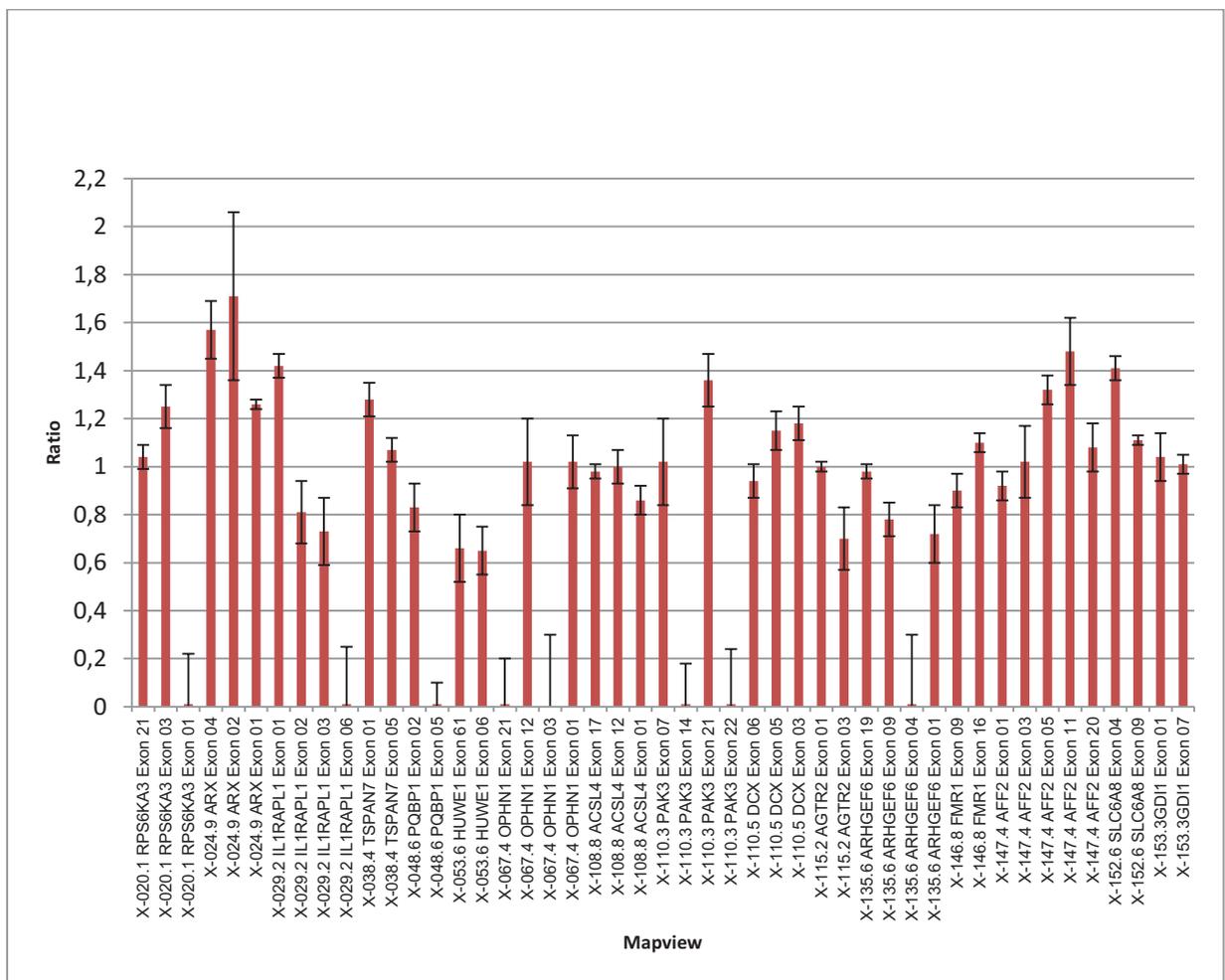


Figura 11: Resultado da amplificação de 39 das 47 sondas no paciente 2.

### Paciente 3

Paciente 3 do sexo feminino, 9 anos, etnia negra. Residente e procedente de Santa Helena de Goiás. Foi encaminhada ao LaGene/Repicon, pelo Hospital das Clínicas, com indicação clínica de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Foram amplificadas 38 sondas. Os éxons 1 do gene RPS6KA3, 6 do gene RAPL1, 05 do gene PQBP1, 3 e 21 do gene OPHN1, 14, 21 e 22 do gene PAK3 e o 4 do gene ARHGEF6 não apresentaram ampliações (Figura 12).

Essa paciente apresentou uma duplicação significativa (valor superior a 1,5), após a normalização dos picos, no éxon 7 do gene PAK3, a qual está relacionada com deficiência intelectual não síndrômica. Essa alteração justifica os sinais clínicos apresentados pela paciente, tais como o déficit intelectual, a dificuldade de aprendizagem e a irritabilidade. Como PAK 3 está localizado no cromossomo X, provavelmente, essa paciente é portadora de uma duplicação heterozigótica do gene PAK3, o que deve ser confirmado por outros ensaios moleculares, tais como o sequenciamento gênico. A análise desse gene nos pais, também será importante para o aconselhamento genético e liberação dos resultados. Como nos demais casos, paciente 3 também não apresentou alterações no número de cópias do gene FMR1.

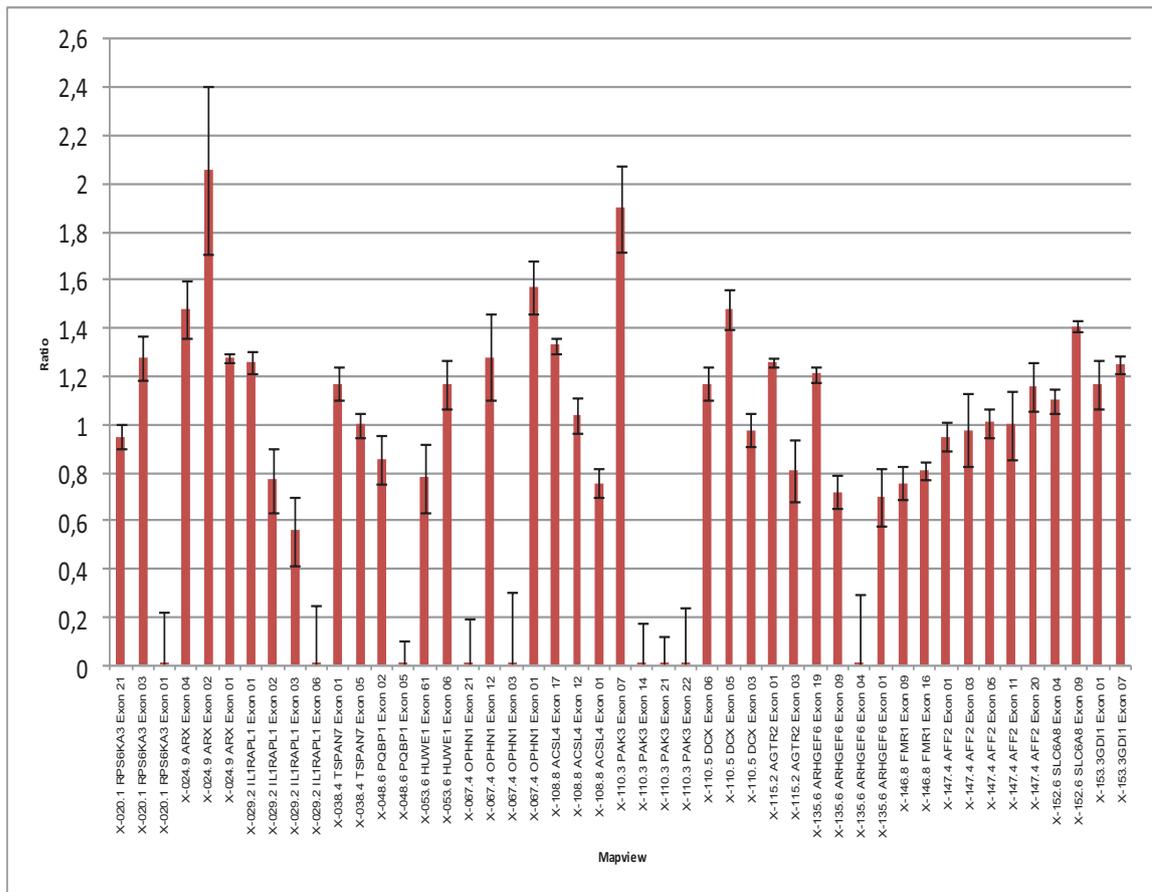


Figura 12: Resultado da amplificação de 38 das 47 sondas no paciente 3.  
**Paciente 4**

Paciente 4 do sexo masculino, 9 anos, etnia negra, residente e procedente de Goiânia. Cursa o 2º ano do ensino fundamental, possui atraso do desenvolvimento, macrocefalia, macrognatia, orelhas em abano e dificuldade escolar.

Após a realização da técnica de MLPA, das 47 sondas, apenas 15 amplificaram. No entanto, após a normalização dos dados, não foram detectadas alterações no número de cópias das regiões amplificadas (Figura 13)

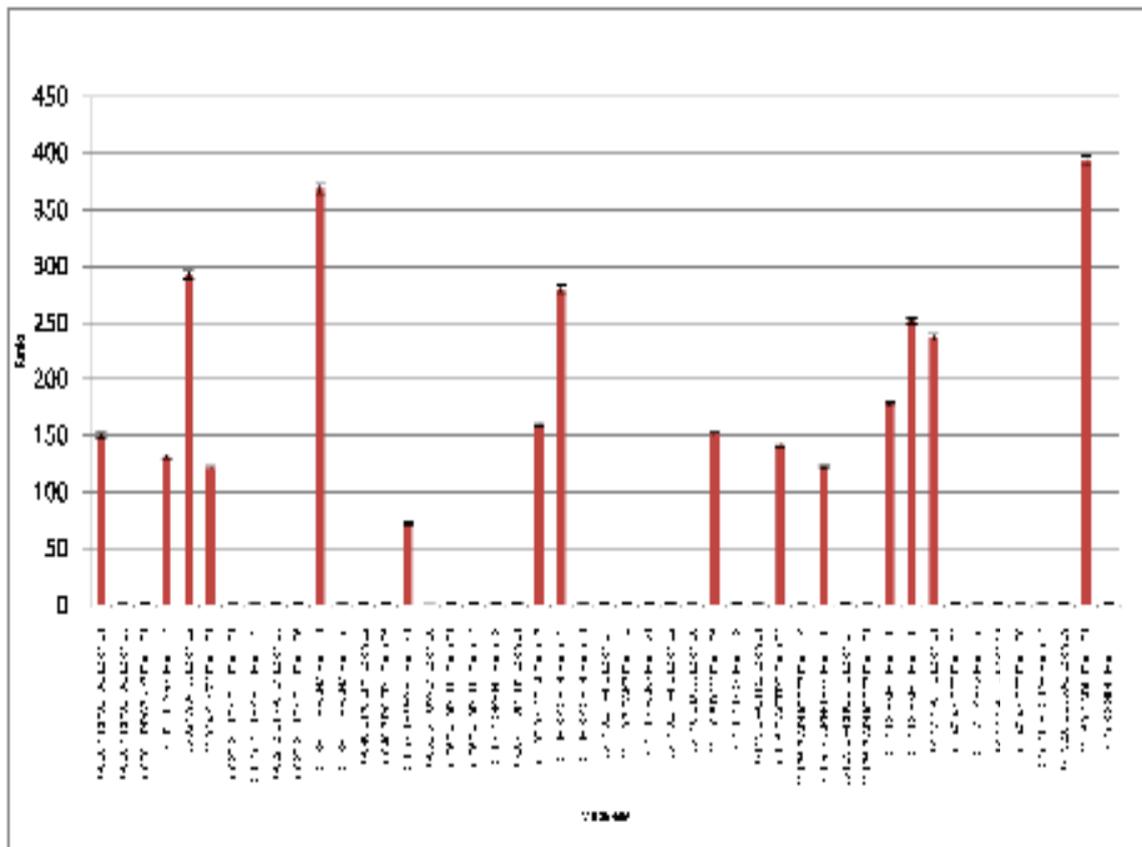


Figura 13. Resultado da amplificação de 15 das 47 sondas no paciente 4.

## Paciente 5

Paciente 5 do sexo masculino, 13 anos, procedente e residente em Goiânia, etnia negra, com suspeita da SXF. Foi encaminhado do Hospital das Clínicas, ao LaGene/Replicon para a realização da técnica molecular para a SXF. Das 47 sondas, apenas 27 amplificaram (Figura 14). Após a normalização dos dados, nenhum pico foi validado, conforme estabelecido no programa *Coffalyser V. 9.4* (Citogem).

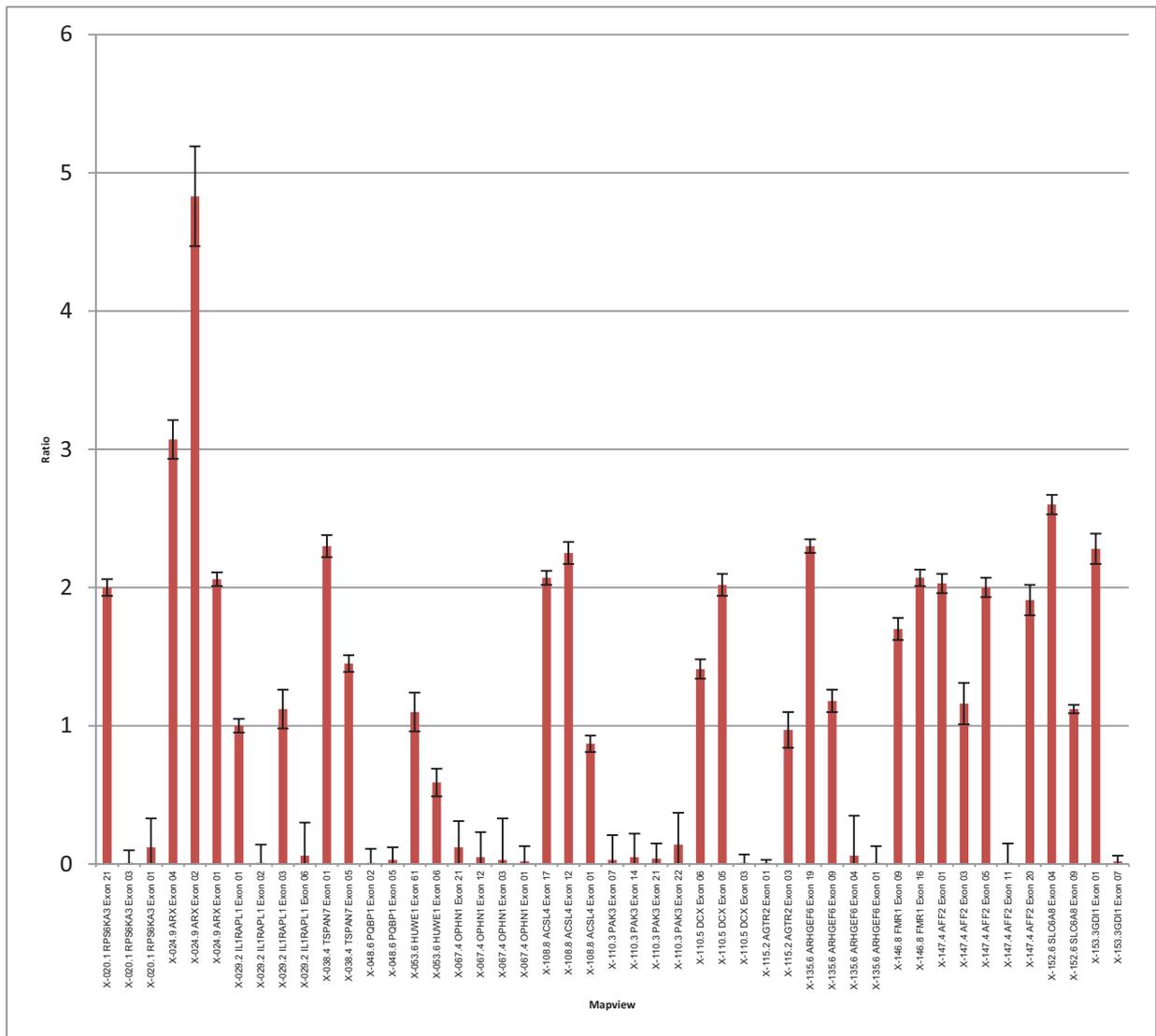


Figura 14: Resultado da amplificação de 27 das 47 sondas no paciente 5.

## 4 Discussão

A técnica de MLPA é utilizada principalmente para a identificação de duplicações e deleções em um grande número de sequências simultaneamente. Apesar da simplicidade técnica dessa metodologia, nesse estudo, amplificações foram obtidas em 15% dos pacientes para as regiões genômicas de interesse, indicando baixo rendimento dos produtos. Todos os pacientes analisados, assim como o indivíduo controle, apresentaram DNA em concentrações superiores a 40 ng/uL, além disso, todo o DNA analisado também foi considerado de alta qualidade, como demonstrado pelo software de quantificação. Todavia, durante a análise de dados, os picos de amplificação não foram visualizados, na grande maioria dos pacientes (75%), indicando falhas durante a ligação da mistura de sondas ao DNA genômico. Além disso, nesse estudo, o Kit Salsa MLPA P106-B1 MRX foi considerado desvantajoso na triagem de pacientes com suspeita da SXF, por ser caro, não detectar o número de cópias do gene FMR1 e nem o status de metilação da região promotora desse gene, sendo dessa maneira, inespecífico para a SXF, devendo ser validado com outras metodologias, como PCR e sequenciamento.

No entanto, Carvalho *et al.* (2009) ressaltaram que grande parte dos estudos para investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com DI idiopático demonstraram a eficácia da técnica de MLPA para detectar alterações genômicas, Porém há dúvidas em relação a sua sensibilidade, uma vez que em alguns houve resultados falso-positivos. Como exemplo, Monfort *et al.* (2006) utilizaram três kits de MLPA para analisar 95 pacientes com DI idiopática associada a sinais dismórficos e 22 controles sem alteração. Foram detectadas alterações entre os pacientes, todas confirmadas pela técnica de FISH ou análises de microssatélites. Já no grupo controle foram detectados quatro resultados alterados, entre deleções e duplicações, provavelmente relacionados a polimorfismos genômicos mostrando a necessidade de confirmação dos resultados alterados por outro *kit* da mesma técnica ou então outro método. Segundo Monfort *et al.* (2006), a técnica de MLPA apresentou um custo baixo, foi menos laboriosa e, uma vez utilizando-se outros kits comerciais para a confirmação de seus resultados e detecção de polimorfismos, poderia ser incluída em análises de rotina da DI idiopática.

Por outro lado, Ávila (2009) avaliou a aplicabilidade de MLPA para identificar rearranjos subteloméricos em pacientes com DI idiopática e chegou a conclusão que é necessário afinar alguns parâmetros da separação de fragmentos por eletroforese capilar; uniformizar o método de extração e tampão de solubilização do DNA a testar; e porta-se com cautela na interpretação dos resultados e atender sempre ao contexto da patologia em estudo, bem como do total das amostras na mesma corrida. Posto isto, a MLPA, trata-se de uma técnica simples e exequível no contexto do rastreio pretendido, mas que não dispensa na totalidade a utilização esporádica de sondas de FISH ou de outras metodologias para validação do diagnóstico.

Ahn *et al.* (2007), analisaram rearranjos subteloméricos pela técnica de MLPA. Os resultados mostraram que a MLPA como uma técnica altamente eficiente para análise de desequilíbrio subtelomérico, com intervalos de confiança de 95% para positivo e negativo, tendo uma precisão de 0,951-0,996 e 0,9996-1 respectivamente. A eficácia desta abordagem foi demonstrada durante 15 meses de testes para diagnóstico, com a participação de 455 pacientes foram testados e 27 (5,9%) casos anormais foram detectados.

Todavia, nesse estudo, dos cinco pacientes com resultados de hibridização positiva, nenhum apresentou alterações detectáveis, no número de cópias do gene FMR1. No entanto, em uma paciente do sexo feminino, de 09 anos de idade e com indicação clínica de SXF, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e irritabilidade, foi encontrada uma duplicação heterozigótica do éxon 7 do gene PAK3. Esse gene está localizado na região Xq23 (Figura 17), sendo capaz de codificar uma proteína cinase 3 ativada pela proteína p21, denominada de PAK3. As proteínas PAK3 são fundamentais para organização do citoesqueleto nos fusos dendríticos estando associadas à plasticidade sináptica. Defeitos no gene PAK3 podem causar a deficiência intelectual ligado ao X não síndrômico.

Des Portes *et al.* (1997) relataram uma família francesa que continha 6 crianças do sexo masculino com deficiência intelectual ligada ao X não síndrômico. Todos os indivíduos afetados apresentavam deficiência intelectual de moderada a severa, sem convulsões, baixa estatura ou outras anormalidades físicas, assim como a paciente desse estudo. Gedeon *et al.* (2003) também demonstraram em um família Australiana, 19 indivíduos, de 5 gerações distintas, com deficiência intelectual ligada ao X não síndrômico. Alguns desses indivíduos tinham déficit cognitivo

limítrofe, orelhas em abano e sem outras alterações físicas. Quatro dos 19 indivíduos apresentavam problemas psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, embora, as irmãs portadoras desses indivíduos não apresentavam anormalidades. No entanto, nesse estudo, a criança do sexo feminino apresentou uma duplicação heterozigótica do gene PAK3, que pode explicar a indicação clínica evidenciada pelo médico assistente. Provavelmente, a paciente estudo apresentou uma inativação do cromossomo X não mutado, o que pode explicar o fenótipo de deficiência intelectual ligada ao X não síndrômico.

Peippo *et al.* (2007) também detectaram a deficiência intelectual relacionado ao gene PAK3, em uma família filandesa. Foram detectadas alterações nesse gene, apenas em indivíduos do sexo masculino, os quais apresentavam microcefalia, orelhas em abano, lábios superiores finos, palato alto e fala desarticulada, além de problemas comportamentais, como agressividade e ansiedade. Ao contrário do que foi relatado por Peippo *et al.* (2007), e assim como o detectado nesse estudo, as mulheres portadoras do gene PAK3 manifestaram problemas de aprendizagem e desordens intelectuais, devido à inativação aleatória do cromossomo X.

Rejeb *et al.* (2008) relataram uma família da Tunísia com PAK3 e deficiência intelectual. O fenótipo foi relativamente homogêneo, entre os afetados, sendo caracterizado por microcefalia, hipotonia e disfunção motora. Os indivíduos afetados eram agressivos, hiperativos e agitados, assim como a paciente desse estudo.

Assim, a técnica de MLPA, parece ser promissora na detecção de rearranjos subteloméricos, como mostrado por outros estudos (Ahn *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009; Ávila, 2009). Mas, para detectar alterações no número de cópias de genes, como o FMR1, a técnica não se mostrou eficaz, sendo de baixa sensibilidade e especificidade, nesse estudo. Segundo Todorov *et al.*, 2009, a combinação das técnicas de PCR e MLPA possibilitaria a melhor avaliação da metilação das ilhas CpG e grandes deleções e duplicações nos genes FMR1 e FMR2. Além disso, a MLPA detecta apenas a mutação completa, omitindo a pré-mutação. Nesse estudo, a técnica de MLPA, com a utilização do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX não detectou alterações no número de cópias do gene FMR1 em nenhum dos pacientes analisados, sendo necessária a utilização de outras metodologias moleculares, mais baratas e sensíveis, como a PCR qualitativa.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização desse estudo, foram concluídos que:

- O Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX não foi específico para detectar alterações no número de cópias do gene FMR1, em pacientes com suspeita da SXF;
- O Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX não se mostrou sensível e específico na detecção de portadores da SXF;
- O Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX é oneroso e difícil de ser validado, mesmo ao se utilizar DNA de boa qualidade e com concentrações acima de 40 ng/ul;
- As sondas referentes ao gene FMR1 foram amplificadas nos 5 pacientes, mas em nenhum foram detectadas alterações no número de cópias (deleções e/ou duplicações) desse gene;
- A técnica de MLPA, com o uso do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX, não deverá ser utilizada para se triar pacientes com suspeita da SXF, especialmente em pacientes atendidos pelo SUS, devido ao alto custo e pela necessidade de validação com outra metodologia molecular.
- Esse estudo contribuiu para verificar a inadequação da técnica do MLPA, com o uso do Kit SALSA MLPA P106-B1 MRX para pacientes da rede pública de saúde, com suspeita da SXF.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN., J., W. OGILVIE., C., M. WELCH., A. THOMAS., H. MADULA. HILLS., R., DONAGHUE., R., A., C. KATHY., M. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. **BMC Med Genet**; 8: 9. 2007.

ARRIETA, M.I., RAMIREZ, J.M., TELEZ, M., FLORES, P., CRIADO, B., BARASOAIN, M., HUERTA, I., GONZALEZ, A.J. Analysis of the Fragile X Trinucleotide Repeat in Basques: Association of Premutation and Intermediate Sizes, Anchoring AGGs and Linked Microsatellites with Unstable Alleles. **Curr Genomics**, v.9(3), p.191-9, 2008.

ÀVILA, M., S. **Rearranjos subteloméricos em doentes com atraso mental idiopático**. Portugal, 2009. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Lisboa.

BARBATO, I., T. **Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X Frágil: Estudo Clínico e Neuroquímico**. Santa Catarina, 2006. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina.

BARDONI, B., DAVIDOVIC, L., BENSALD, M., KHANDJIAN, E.W. The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. **Expert Rev Mol Med**, v.8(8), p.1-16, 2006.

BECHARA, E.G., DIDOT, M.C., MEIKO, M., DAVIDOVIC, L., BENSALD, M., MARTIN, P., CASTETS, M., POGNONEC, P., KHANDJJAN, E.W., MOINE, H., BARDONI, B. A novel function for Fragile X mental retardation protein in translational activation. **Plos Biology**, vol. 7, n. 1, jan. 2009.

BEILINA, A., TASSONE, F., SSSCHWARTZ, P. H., SAHOTA, P., HAGERMAN, P. J. Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. **Hum Mol Genet**. 13: 543-9. 2004.

BHOGAL, B., JOGENS, T.A. Fragile X syndrome and model organisms: identifying potential routes of therapeutic intervention. **Dis Model Mech**, v.3(11-12)p.693-700, 2010.

BIACSI, R., KUMARI, D., USDIN, K. SIRT1 Inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome. **Plos Genetics**, vol. 4, n. 3, mar. 2008.

BOY, R., CORREIA, P. S., LLERENA, J. C., MACHADO-FERREIRA, M. C., PIMENTEL, M. M. G. Síndrome do X Frágil: Estudo de caso controle envolvendo pacientes pré e pós puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. **Arq Neuropsiquiatr**, vol. 59, n. 1, mar. 2001.

BOURGEOIS, J., COFFEY, S., RIVERA, S.M., HESSL, D., GANE, L.W., TASSONE, F., GRECO, C., FINUCANE, B., NELSON, L., BERRY-KRAVIS, E., GRIGSBY, J.,

HAGERMAN, P.J., HAGERMAN, R.J. Fragile X premutation disorders – expanding the psychiatric perspective. **Jounal Clinical Psychiatry**, vol. 70, n. 6, jun. 2009.

BRUN-GASCA, C. Se puede atribuir el fenotipo conductual del síndrome X frágil al retraso mental y al trastorno por déficit de atención/hiperactividad? Can the behavioural phenotype of fragile x syndrome be attributed to mental retardation and to attention deficit hyperactivity disorder? **Rev Neurol**, v.38(1), p.7-11, 2004.

BRUNONI, D. Aconselhamento Genético. **Ciênc. saúde coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, 2002.

CARDOZO, A., SOARES, B. Habilidades sociais e o envolvimento entre pais e filhos com deficiência intelectual. **Psicologia: ciência e profissão**, 2011, 31 (1), 110-119.

CARVALHO, M. **Síndrome do X-Frágil – Guia para Famílias e Profissionais**. Ribeirão Preto: SBG, 2003.

CARVALHO, C.R.L. **Técnica de MLPA: uma alternativa para investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática**: implantação de método no Departamento de Genética Medica da FCM-UNICAMP. São Paulo, 2009. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual de Campinas.

CHONCHAIYA, W., UTARI, A., PEREIRA, G.M., TASSONE, F., HESSI, D., HAGERMAN, R.J. Broad clinical involvement in a family affected by the fragile X premutation. **J Dev Behav Pediatr**, v.30(6), p.544-51, 2009.

CHRISTOFOLINI, D.M., LIPAY, M.V.N., RAMOS, M.A.P., COSTA, S.S., BELLUCCO, F.T.S., NOGUEIRA, S.I., KULIKOWSKI, L.D., BRUNONI, D., MELARAGNO, M.I. Clinical checklists in the selection of mentally retarded males for molecular screening of fragile X syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, 30, 4, 1047-1050, 2007.

COFFEE, B., KEITH, K., ALBIZUA, I., MALONE, T., MOWREY, J., SHERMAN, S.L., WARREN, S.T. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. **Am J Hum Genet**, v.85(4), p.503-14, 2009.

COLLINS, S.C., COFFEE, B., BENKE, P.J., BERRY-KRAVIS, E., GILBERT, F., OOSTRA, B., HALLEY, D., ZWICK, M.E., CUTLER, D.J., WARREN, S.T. Array-based FMR1 sequencing and deletion analysis in patients with a fragile X syndrome-like phenotype. **PLoS One**, v.5(3), p. e9476, 2010.

CROEN, LA, GREYER, JK, SELVIN, S. The epidemiology of mental retardation of unknown cause. **Pediatrics**. 2001;107(6):e86.

CRUZ-MARTIN, A., CRESPO, M., PORTERA-CAILLIAU, C. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. **J Neurosci**, v.30(23), p.7793-803, 2010.

DES PORTES, V., SOUFIR, N., CARRIE, A., BILLUART, P., BIENVENU, T., VINET, M. C., BELDJORD, C., PONSOT, G., KAHN, A., BOUE, J., CHELLY, J. Gene for

nonspecific X-linked mental retardation (MRX 47) is located in Xq22.3-q24. **Am. J. Med. Genet.** 72: 324-328, 1997.

*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fourth Edition. Text revision DSM-IV-TR. **American Psychiatric Association**. 2003.

DOBYNS, W.B., FIALURO, A., TOMSON, B.N., CHAN, A.S., HO, A.W., TING, N.T., OOSTERWIJK, J.C., OBER, C. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. **Am J Med Genet A**, v.129A(2), p.136-43, 2004.

DOLEN, G., OSTERWEIL, E., RAO, B.S., SMITH, G.B., AUERBACH, B.D., CHATTARJI, S., BEAR, M.F. Correction of fragile X syndrome in mice. **Neuron**, v.56(6), p. 955-62, 2007.

FERNANDEZ-CARVAJAL, I., LOPEZ POSADAS, B., PAN, R., RASKE, C., HAGERMAN, P.J., TASSONE, F. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. **J Mol Diagn**, v.11(4), p.306-10, 2009.

GEDEON, A. K., NELSON, J., GECZ, J., MULLEY, J. C. X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. **Am. J. Med. Genet.** 120A: 509-517, 2003.

FARAH, S.B. **Terapia Gênica: Consertando o gene**. I DNA Segredos e Mistérios. São Paulo: Savier, 1997; p.141, 1997.

FERRANDO LUCAS, M.T., BANUS GOMEZ, P., LOPEZ PEREZ, G. Cognitive aspects in girls with fragile X syndrome. **Rev Neurol**, v.38 Suppl 1, p.S53-7, 2004.

FINUCANE, B, HAAS-GIVLER, B, SIMON, EW. Genetics, mental retardation, and the forging of new alliances. **Am J Med Genet.** 2003;117C:66-72.

FILIPOVIC-SADIC, S., SAH, S., CHEN, L., KROSTING, J., SEKINGER, E., ZHANG, W., HAGERMAN, P.J., STENZEL, T.T., HADD, A.G., LATHAM, G.J., 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**, v.56(3), p.399-408, 2010.

FLORENCIA, G., IRENE, S., VERONICA, F. Fragile-X mental retardation: molecular diagnosis in Argentine patients. **J Biochem Mol Biol**, v. 39(6), p.766-73, 2006.

FRANÇA, D., C. MARIA, D., M., C. CORREA, I., P., C. ABURAD, A., T., T. AGUIAR, S., M., H., C., A. Síndrome do X-Frágil: Relatode caso. **Revista FAIPE**. V.1, n.1. 2011.

FUNARI, M.F.A. **Identificação de deleções do gene SHOX: comparação das técnicas de FISH, análise de microssatélites e MLPA**. SP, 2010. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

GARCIA-AROCENA, D., HAGERMAN, P.J. Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. **Hum Mol Genet**, v.19(R1), p.R83-9, 2010.

GARCÍA-NONELL, C., RIGAU-RATERA, E., ARTIGAS-PALLARÉS, J. Autismo en el síndrome X frágil/ Autism in fragile X syndrome. **Rev Neurol**, v.42(supl.2), p.s95-s98, 2006.

GARRAFA, V., OSELKA, G. DINIZ, D. **Saúde Pública, bioética e equidade**. In: Congresso Brasileiro de saúde coletiva, 5, 1997, Águas de Lindóia. Anais. Rio de Janeiro: Abrasco, 1997. p. 59-67.

GODLER, D.E., TASSONE, F., LOESCH, D.Z., TAYLOR, A.K., GEHLING, F., HAGERMAN, R.J., BURGESS, T., GANESAMOORTHY, D., HENNERICH, D., GORDON, L., EVANS, A., CHOO, K.H., SLATER, H.R. Methylation of novel markers of fragile X alleles is inversely correlated with FMRP expression and FMR1 activation ratio. **Hum Mol Genet**, v.19(8), p.1618-32, 2010.

GROSS, C., NAKAMOTO, M., YAO, X., CHAN, C.B., YIM, S.Y., WARREN, S.T., BASSELL, G.J. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. **J Neurosci**, v.30(32), p.10624-38, 2010.

GROSSMAN, A.W., ALDRIDGE, G.M., LEE, K.J., ZEMAN, M.K., JUN, C.S., AZAM, H.S., ARIJ, T., IMOTO, K., GREENOUGH, W.T., RHYU, I.J. Developmental characteristics of dendritic spines in the dentate gyrus of Fmr1 knockout mice. **Brain Res**, v.1355, p.221-7, 2010.

GRANT, C.M., APPERLY, I., OLIVER, C. Is theory of mind understanding impaired in males with fragile X syndrome? **J Abnorm Child Psychol**, v.35(1), p.17-28, 2007.

HALL, S.S., LIGHTBODY, A.A., HIRT, M., REZVANI, A., REISS, A.L. Autism in fragile X syndrome: a category mistake? **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v.49(9), p.921-33, 2010.

HANSON, J.E., MADISON, D.V. Presynaptic FMR1 genotype influences the degree of synaptic connectivity in a mosaic mouse model of fragile X syndrome. **J Neurosci**, v.27(15), p.4014-8, 2007.

HAGERMAN, R., HOEM, G., HAGERMAN, P. Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. **Mol Autism**, v.1(1), p.12, 2010.

HESSL, D., TASSONE, F., LOESCH, D.Z., BERRY-KRAVIS, E., LEEHEY, M.A., GANE, L.W., BARBATO, I., RICE, C., GOULD, E., HALL, D.A., GRIGSBY, J., WEGELIN, J.A., HARRIS, S., LEWIN, F., WEINBERG, D., HAGERMAN, P.J. and HAGERMAN, R.J. Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 139: 115-21. 2005.

HALL, S.S., MAYNES, N.P., REISS, A.L. Using percentile schedules to increase eye contact in children with fragile X syndrome. **Journal of applied behavior analysis**, vol. 42, n. 1, 2009.

JOHNSON, V.A. Checklist assessments of FMR1 gene mutation phenotypes. **J Cult Divers**, v.15(3), p.117-31, 2008.

JORDE, L.B., CAREY, J.C., BAMSHAD, M.J., WHITE, R.L. **Genética Médica**. São Paulo: Elsevier 2004.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**. 2001; 294:1030-38.

KACHANI, A.T., CORDÁS, T.A. Anorexia nervosa e retard mental. **J Bras Psiquiatr**. 2011; 60(1): 57-63.

KHALIL, A.M., FAGHIHI, M.A., MODARRESI, F., BROTHERS, S.P.; WAHLESTEDT, C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in Fragile X Syndrome. **Plos One**, vol.3, n. 1, jan.2008.

KIM, A.C. O pediatra e o aconselhamento genético. **Revista Pediatra**. 2005; 27(1).

KUMARI, D., SOMMA, V., NAKAMURA, A.J., BONNER, W.M., D'AMBROSIO, E., USDIN, K. The role of DNA damage response pathways in chromosome fragility in Fragile X syndrome. **Nucleic Acids Research**, vol. 37, n. 13, abr. 2009.

KUMARI, D., USDIN, K. The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. **Hum Mol Genet**, v.19(23), p.4634-42, 2010.

LAMÔNICA D.A.C., FERRAZ, P.M.D.P., FERREIRA, A.T., PRADO, L.M., ABRAMIDES, D.V.M., GEJÃO, M.G. Síndrome do X Frágil com variante de Dandy-Walker: estudo clínico das manifestações comunicativas orais e escritas. **J Soc Bras Fonoaudiol**. 2011;23(2):177-82.

LIANG, S.; BASS, H.N.; GAO, H.; ASTBURY, C., JAMEHDOR, M.R.; QU, Y. A pseudo-full mutation identified in Fragile X assay reveals a novel base change abolishing an *ecoRI* Restriction site. **Jounal of Molecular Diagnostics**, vol. 10, n. 5, set. 2008.

LUBS, H.A. A marker X chromosome. **Am. J. Hum. Genet**. 21: 231-244, 1969.

LUCKASSON, R., BORTHWICK-DUFFY, S., BUNTINX, W.H.E., COULTER, D.L., CAIG, E.M., REEVE, A., SHALLOCK, R.I., SNELL, M.E., SPITALNIK, D.M.E., SPREAT, S. & TESSÉ, M.J. (2002) **Mental retardation: definition, classification and systems of supports** (10a. edição), Washington (DC): American Association on Mental Retardation.

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociência: Fundamentos para reabilitação**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2004.

LUO, X.F., ZHONG, J.M., ZHANG, X.Z., ZOU, Y., CHEN, Y., WU, H.P., YU, X.P. Hair root fragile X mental retardation protein assay for the diagnosis of fragile X syndrome. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v.11(10), p.817-20, 2009.

MONFORT, S., ORELLANA, C., OLTRA, S., ROSELLÓ, M., GUITART, M., MARTÍNEZ, F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. **J Lab Clin Méd** 2006; 147:295-300.

NOLIN, S.D., DING, X.H., HOUCK, G.E., BROWN, W.W., DOBKIN, C. Fragile X full mutation alleles composed of few alleles: implications for CGG repeat expansion. **Am J Med Genet A**, v.146A(1), p.60-5, 2008.

OOSTRA, B.A., WILLEMSSEN, R. FMR1: a gene with three faces. **Biochim Biophys Acta**, v.1790(6), p.467-77, 2009.

PEIPPO, M., KOIVISTO, A. M., SARKAMO, T., SIPPONEN, M., von KOSKULL, H., YLISAOKKO-OJA, T., REHNSTROM, K., FROYEN, G., IGNATIUS, J., JARVELA, I. PAK3 related mental disability: further characterization of the phenotype. **Am. J. Med. Genet.** 143A: 2406-2416, 2007.

POUYA, A.R., ABEDINE, S.S., MANSOORIAN, N., BEHJATI, F., NIKZAT, N., MOHSENI, M., NIEH, S.E., ABBASI MOHEB, L., DARVISH, H., MONAJEMI, G.B., BANIHASHEMI, S., KAHRIZI, K., ROPERS, H.H., NAJMABADI, H. Fragile X syndrome screening of families with consanguineous and non-consanguineous parents in the Iranian population. **Eur J Med Genet** v.52(4), p.170-3, 2009.

QUEIROZ, M.A. **Avaliação de Pré-Mutação por PCR na Síndrome do X-Frágil.** Florianópolis, 2006. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina.

QUEIROZ, L.B. **Avaliação da Técnica de Imuno-histoquímica (Bulbo de Cabelo) para Portadores da Síndrome do X Frágil. Comparação com as Técnicas Citogenética e Molecular (PCR).** Brasília, 2007. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/UnB.

RAMAKERS, G.J.A. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. **Trends Neurosci.** 2002;25(4):191-9.

REIS, A.H.O. **Freqüência da pré-mutação em FMR1 em pacientes com ataxia, tremor e/ou parkinsonismo.** Belo Horizonte, 2006. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

REJEB, I., SAILLOUR, Y., CASTELNAU, L., JULIEN, C., BIENVENU, T., TAGA, P., CHAABOUNI, H., CHELLY, J., JEMAA, L. B., BAHY-BUISSON, N. A novel splice mutation in PAK3 gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features. **Europ. J. Hum. Genet.** 16: 1358-1363, 2008.

RICHARDS, B.W.; SYLVESTER, P.E.; BROOKER, C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. **J. Ment. Defic. Res.** 25: 253-256, 1981.

RIFÉ, S.B.A., SÁNCHEZ DÍAZA, B.F., RAMOSC y M. MILÀ RECASENSA. **Estudio de La proteína FMRP en la raíz de cabello: aplicación al diagnóstico del síndrome Del cromosoma X frágil. Servicio de Genética. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic.** Barcelona. España. blnstitut d'Investigacions

Biomèdiques August Pi i Sunyer. Barcelona. España. Cátedra de Pediatría. Universidad de Zaragoza. España. - *An Pediatr (Barc)* ;59(5):431-5 ). 2003.

RITTEY, C.D. Learning difficulties: what the neurologist needs to know. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2003;74 Suppl I:30-36.

RODRIGUEIRO, D. A. **Síndrome do cromossomo X-Frágil: análise intrafamiliar das características clínicas, psicológicas, fonoaudiológicas e moleculares**. Botucatu, 2006. [Tese de doutorado]. Universidade Estadual Paulista-Botucatu.

RODRIGUEZ-REVENGA, L., PAGONABARRAGA, J., GÓMEZ-ANSON, B., LÓPEZ-MOURELO, O., MADRIGAL, I., XUNCLÀ, M., KULISEVSKY, J., MILÀ, M. Motor and mental dysfunction in mother-daughter transmitted FXTAS. **Neurology**, v.75(15), p.1370-6, 2010.

ROSALES-REYNOSO, M.A., OCHOA-HEMÁNDEZ, A.B., BARROS-NUNEZ, P. Diseases caused by triplet expansion. **Rev Neurol** v.49(2), p.79-87, 2009.

RUEDA, J.R., BALLESTEROS, J., TEJADA, M.I. Systematic review of pharmacological treatments in fragile X syndrome. **BMC Neurol**, v.9, p.53, 2009.

RUIZ, L.R., BORGARELLO, M.Q., AYTÉS, L.B., ESCODA, C.G. Fragile X-syndrome: literature review and report of two cases. **Medicina Oral**, vol. 14, n. 9, set. 2009.

SCHOUTEN, J. P.; MCELGUNN, C. J.; WAAIJER, R.; ZWIJNENBURG, D.; DIEPVENS, F.; PALS, G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**. Jun 25; 30(12): e57. 2002.

SHEN, Y ., WU, B.L. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. **J. Genet Genomics**, v.36(4), p. 257-65, 2009.

SHERMAN, S.L. Epidemiology in: Hagerman, R. J.; Silverman, A.C., eds. **Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research**. Baltimore, London: The Johns Hopkins University Press, 1991, p. 69-97.

SHERMAN, S.L., JACOBS, P.A., MORTON, N.E., FROSTER-ISKENIUS, U., HOWARD-PEEBLES, P.N., NIELSEN, K.B., PARTINGTON, M.W., SUTHERLAND, G.R., TURNER, G., WATSON, M. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. **Hum. Genet**. 69: 289-299, 1985.

SILVA., R.C.G. **O conhecimento de genética consolidado para o diagnóstico da Síndrome do X-frágil e o desafio da sua inclusão nas políticas públicas de saúde**. Goiânia, 2008. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Católica de Goiás.

SOONTARAPORNCHAI, K., MASELLI, R., FENTON-FARRELL, G., TASSONE, F., HAGERMAN, P.J., HESSL, D., HAGERMAN, R.J. Abnormal nerve conduction features in Fragile X premutation carriers, **Arch. Neurol.**, vol. 65, n. 4, abr. 2008.

STEINER, C.E., GUERREIRO, M.M., MARQUES-DE-FARIA, A.P., LOPES-CENDES, I. Laboratorial diagnosis of fragile-X syndrome: experience in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. **Arq Neuropsiquiatr**, v.63(3A), p.564-70, 2005.

SUEMASU, C.N. **Caracterização dos genótipos da talassemia alfa deletional por MLPA**. SP, 2010. [Dissertação de mestrado]. Universidade Estadual de Campinas.

TABOLACCI, E., MOSCATO, U., ZALFA, F., BAGNI, C., CHIURAZZI, P., NERI, G. Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. **Eur J Hum Genet**, v.16(12), p.1487-98, 2008.

TAN, H., LI, H., JIN, P. RNA-mediated pathogenesis in fragile X-associated disorders. **Neurosci Lett**, v.466(2), p.103-8, 2009.

TASSONE, F. and Hagerman, P.J. Expression of the FMR1 gene. **Cytogenet Genome Res**. 100: 124-8. 2003.

TODOROV, T., TODOROVA, A., KIROV, A., DIMITROV, B., CARVALHO, R., NYGREN, A.O.H., BONEVA, I., MITEV, V. **Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA**. *BMJ Case Rep*. 2009; 2009: bcr06.2008.0139.

UEHARA, D.T. **Pesquisa de microarranjos em genes candidatos a surdez síndrômica e não-sindrômica**. São Paulo, 2010. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo.

VAN ESCH, H. The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences. **Eur J Med Genet**, v.49(1), p.1-8, 2006.

VASCONCELOS, M.M. Mental retardation. **Jornal de pediatria**, 2004.

VEIGA, M.F., TORALLES, M.B.P. A expressão neurológica e o diagnóstico genético nas síndromas de Alge-man, de Rett e do X – Frágil. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 1, jul.-ago. 2002.

VERKERK, A.J.M.H.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J.S.; FU, Y.H.; KUHL, D.P.; PIZZUTI, A.; REINER, O. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**. 65: 905- 914, 1991.

WARREN, S.T.; SHERMAN, S.L. **The fragile X syndrome**. In: SCRIVER, C.R. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: McGRAW-HILL, 2001. p. 1257-1289.

YIM, S.Y., JEAN, B.H., YANG, J.A., KIM, H.J. Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. **J Korean Med Sci**, v.23(3), p.470-6, 2008.

YONAMINE, S.M., DA SILVA, A.A. Características da comunicação em indivíduos com a síndrome do X Frágil. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 60, n. 4, São Paulo dez. 2002.

ZEIER, Z., KUMAR, A., BODHINATHAN, K., FELLER, J.A., FOSTER, T.C., BLOOM, D.C. Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. **Gene Ther**, v.16(9), p.1122-9, 2009.

## ANEXO I

## KIT SALSA MLPA

## SALSA MLPA P106-B1 MRX

Comprimento (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posição do cromossomo
64-70-76-82	Fragmentos-Q: quantidade de DNA; apenas visível com menos de 10 ng de DNA	
88-92-96	Fragmentos-D: baixo sinal de 88 ou 96 nt indicam desnaturação incompleta	
100	Fragmento-X: específico para cromossomo X	
105	Fragmento-Y: específico par cromossomo Y	
118	Fragmento-Y: específico par cromossomo Y	
130*	<b>AGTR2</b> sonda 13917-L02320	Xq24
136±	<b>GDI1</b> sonda 02916-L04199	Xq28
142	<b>FMR1</b> sonda 02928-L03720	Xq27.3
148	<b>ACSL4</b> sonda 02935-L02326	Xq22.3
154±	<b>AFF2</b> sonda 03511-L04202	Xq28
160±	<b>TSPAN7</b> sonda 02903-L02297	Xp11.4
166	<b>FMR1</b> sonda 02927-L03721	Xq27.3
172	<b>ARHGEF6</b> sonda 02901-L02295	Xq26.3
178	<b>RPS6KA3</b> sonda 02907-L02301	Xp22.12
184*	<b>HUWE1</b> sonda 13919-L15456	Xp11.22
190¥~	<b>ACSL4</b> sonda 02155-L15826	Xq22.3
196* ±	<b>ARX</b> sonda 13668-L15819	Xp21.3
202	<b>ARHGEF6</b> sonda 02902-L04460	Xq26.3
208*	<b>SLC6A8</b> sonda 01871-L15827	Xq28
215¥	<b>DCX</b> sonda 04123-L15828	Xq23
220	<b>ARX</b> sonda 02898-L04200	Xp21.3
229*	<b>ARX</b> sonda 13669-L15822	Xp21.3
234¥	<b>IL1RAPL1</b> sonda 02922-L15821	Xp21.3
241¥	<b>AFF2</b> sonda 03516-L15823	Xq28
247¥	<b>ACSL4</b> sonda 03512-L15824	Xq22.3
254*	<b>HUWE1</b> sonda 13920-L15825	Xp11.22
261¥	<b>AFF2</b> sonda 02933-L14362	Xq28
268¥~	<b>TSPAN7</b> sonda 02904-L15820	Xp11.4
275	<b>DCX</b> sonda 04124-L03481	Xq23
283¥	<b>AFF2</b> sonda 00493-L00066	Xq28
292	<b>IL1RAPL1</b> sonda 02920-L02314	Xp21.3
301	<b>SLC6A8</b> sonda 01876-L01445	Xq28
310	<b>PQBP1</b> sonda 02918-L02878	Xp11.23
319¥	<b>DCX</b> sonda 04121-L08390	Xq23

Comprimento (nt)	Sonda SALSA MLPA	Posição do cromossomo
328	<b>IL1RAPL1</b> sonda 02921-L02315	Xp21.3
337	<b>AFF2</b> sonda 02932-L02323	Xq28
346	<b>ARHGEF6</b> sonda 03719-L02293	Xq26.3
355	<b>AGTR2</b> sonda 02925-L02319	Xq24
364	<b>RPS6KA3</b> sonda 02906-L02300	Xp22.12
373	<b>OPHN1</b> sonda 029012-L02306	Xq12
378	<b>GDI1</b> sonda 02917-L02311	Xq28
385	<b>PAK3</b> sonda 02908-L03178	Xq22.3
391	<b>PQBP1</b> sonda 03520-L02313	Xp11.23
400	<b>PAK3</b> sonda 03521-L02304	Xq22.3
409	<b>OPHN1</b> sonda 02913-L02307	Xq12
418	<b>PAK3</b> sonda 02909-L02303	Xq22.3
427	<b>IL1RAPL1</b> sonda 02923-L02317	Xp21.3
436±	<b>OPHN1</b> sonda 02914-L02308	Xq12
445	<b>ARHGEF6</b> sonda 03720-L02294	Xq26.3
454±	<b>RPS6KA3</b> sonda 03762-L02299	Xp22.12
472	<b>OPHN1</b> sonda 02915-L02309	Xq12
481	<b>PAK3</b> sonda 02911-L02305	Xq22.3

\* Nova versão B1

¥ Versão modificada B1. Pequena mudança no comprimento, não detectada na sequência

± Estas sondas estão localizadas longe ou perto da ilha CpG. Pequeno sinal destas sondas indicam desnaturação do DNA incompleta

-Variação. Esta sonda detecta deleções/duplicações de indivíduos doentes.

## Sondas P106-B1 MRX organizadas de acordo com localização do cromossomo

### Gene RPS6KA3, Xp22.12

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon RPS6KA3	Sítio de ligação NM_004586.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	1-3		
178	0207-L02301	Éxon 21	2005-2006	ATCAGAGACTGA-CTGCTGCTCTTG	53.1 Kb
364	02906-L02300	Éxon 3	180-181	AAGGAAGGACAT-GAAAAGGCAGAT	57.3 kb
454	03762-L02299	Éxon 1	38-39	GTGGCAGAAGAT-GGCTGTGGAGAG	4.750 Kb para o gene RMX

Algumas mutações no gene RPS6KA3 causam a Síndrome de Coffin-Lowry.

- P259 Coffin-Lowry: contém mais sondas para RPS6KA3.

### Gene ARX, Xp21.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon ARX	Sítio de ligação NM_139058.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	212-214		
220	02898-L04200	Éxon 4	1635-1634 reverso	GGCTGATGAAAG-CTGGGTGTCTGGA	6.3 Kb
196	13668-L15819	Éxon 2	731-732	GCCGCAGCAAGT-CGTACCGCGAGA	2.4 kb
229	13669-L15822	Éxon 1	98-99	AGATCGCAATAA-TATCCGTTATAA	4.750 Kb para o gene RMX

Mutações no ARX causam alterações ligadas ao X, como espasmos e retardo mental.

- P189 ligado a RETT: contém mais sondas para ARX.

### Gene IL1RAPL1, Xp21.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon IL1RAPL1	Sítio de ligação NM_014271.3	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	509-511		
292	02920-L02314	Éxon 1	245-246	CAGCAAACAATC-GGGCACTTTGAG	201.5 Kb
328	02921-L02315	Éxon 2	518-519	AGATGAAAGCTC-CGATTCCACACT	493.7 kb
234	02922-L15821	Éxon 3	716-717	TTGCCCAAAGTG-CTGGACTCAGTT	385.4 Kb
427	02923-L02317	Éxon 6	716-717	CTCTGACTGATA-AGCCACCCAAGC	8709 Kb para o gene TSPAN7

Mutações do gene IL1RAPL1 tem sido identificadas em famílias com retardo mental não síndromico ligado ao cromossomo X.

### Gene TSPAN7 (TM4SF2), Xp11.4

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon TSPAN7	Sítio de ligação NM_004615.3	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	70-72		
160	02903-L02297	Éxon 1	96-97	ATGGAGACCAAA-CCTGTGATAACC	114.1 Kb
268	02904-L15820	Éxon 5	531-532	TGTGGTGTGCAG-AACTACACCAAC	10220 kb para o gene PQBP1

Mutações no gene TSPAN7 podem causar retardo mental.

### Gene PQBP1, Xp11.23

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon PQBP1	Sítio de ligação NM_005710.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	255-257(exon 2b)		
310	02918-L02878	Éxon 2b	155-156	ATGGAGACCAAA-CCTGTGATAACC	114.1 Kb
391	03520-L02313	Éxon 5	567-568	AAAAGTTGGACC-GGAGCCATGACA	4954 kb para o gene HUWE1

A variação fenotípica do retardo mental ligado ao X é causada pela mutação no gene PQBP1.

- P259 Coffin-Lowry: contém mais sondas para PQBP1.

### Gene HUWE1, Xp11.22

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon HUWE1	Sítio de ligação NM_031407.4	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	403-405		
184	13019-L15456	Éxon 61	8678-8679	ATCTGAGTCCAA-GGAGACCCTTGG	92.7 Kb
254	13920-L15825	Éxon 6	609-610	GCAGATGCTGGA-CAGACAGTGGAG	13509 kb para o gene OPHN1

O comprimento total do gene HUWE1 é 155 Kb. Duplicações neste gene são associadas com retardo mental.

### Gene OPHN1, Xq12

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon OPHN1	Sítio de ligação NM_002547.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	295-297		
472	02915-L02309	Éxon 21	2171-2172	TATCACCAGCAG-CATAGAACCCCC	133.1 Kb
436	02914-L02308	Éxon 12	1351-1352	AGGCCCTTTCAG-AAGCTAACAGAA	101.8 kb
409	02913-L02307	Éxon 3	489-490	CAGACGCTGCAG-TCATTTCAATTT	134.3 Kb
373	02912-L02306	Éxon 1	135-136	TGCTGCTTATCT-GGGAAGGCGATG	41204 Kb para o gene ACSL4

Mutações/deleções ao longo do gene OPHN1 (400 Kb) causam síndrome do retardo mental ligado ao X, com epilepsia e hipoplasia cerebelar.

### Gene ACSL4 (= FAFL4), Xq22.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon ACLSL4	Sítio de ligação NM_022977.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	506-507		
190	02155-L15826	Éxon 17	2534-2535	TAAGCCCAGAGC-CATGGACCCCTG	24.0 Kb
148	02935-L02326	Éxon 12	1880-1881	ATGTCTGCTTCCT-GCTGCCCAATTG	65.1 kb
247	03512-L15824	Éxon 1	173-174	GTCCCAGCGCTA-GCGGGCACGCGG	1390 Kb para o gene PAK3

Mutações/deleções neste gene podem causar retardo mental ou outros sinais associados com a Síndrome de Alport

### Gene PAK3, Xq22.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon PAK3	Sítio de ligação NM_002578.3	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	622-624		
385	02908-L03178	Éxon 7	699-700	CGGGATTCTTCA-GCACTCAACCAC	40.5 Kb
418	02909-L02303	Éxon 14	1296-1297	CCACCCTCTGCT-GAAAATGCCAAT	52.8 kb
400	03521-L02304	Éxon 21	2058-2059	ACTAATGGAACT-CCAGAGCTCCAG	4.0 Kb
481	02911-L02305	Éxon 22	2229-2228 ver.	TTAATTGCTTCC-TTTGCAGCGATA	113 Kb para o gene DCX

Mutações no gene PAK3 causam retardo mental não-sindrômico (MRX30). O comprimento total deste gene é 1370 Kb.

### Gene DCX, Xq23

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon DCX	Sítio de ligação NM_000555.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	173-175 (ex 3)		
275	04124-L03481	Éxon 6	1162-1163	GATGATGTGTTT-ATTGCCTGTGGT	67.9 Kb
215	04123-L15828	Éxon 5	1054-1055	GTCCTCACTGAT-ATCACAGAAGCC	9.8 kb
319	04121-L08390	Éxon 3	295-296	CAGGCTATGGAT-TCATTTACAACCT	4675 Kb para o gene AGTR2

Mutações no gene DCX (118 Kb), causam Lissencefalia.

- P061 Lissencefalia: contém mais sondas para DCX.

### Gene AGTR2, Xq24

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon AGTR2	Sítio de ligação NM_000686.4	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	208-210 (ex 3)		
355	02925-L02319	Éxon 1	70-71	TGAGAGAACGAG-TAAGCACAGAAT	2.1 Kb
130	13917-L02320	Éxon 3	812-813	TTTCCCACCTGA-GAAATATGCCCA	20367 kb para o gene ARHGEF6

Mutações no gene AGTR2 causam retardo mental não-sindrômico (MRX88).

### Gene ARHGEF6, Xq26.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon ARHGEF6	Sítio de ligação NM_004840.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	463-465		
202	02902-L04460	Éxon 19	2439-2440	GATGCTCAAATC-CTTAAAGTGATC	31.9 Kb
172	02901-L02295	Éxon 9	1414-1415	ACAAAGTAGGAG-GTTGTCTACTGA	38.3 kb
445	03720-L02294	Éxon 4	829-830	GTGGACGTTCCCT-CTTCTCTTAGTG	35.5 Kb
346	03719-L02293	Éxon 1	532-533	CTAAAAAGACCA-TCTGTGATCCGG	11131 Kb para o gene FMR1

Mutações no gene ARHGEF6 tem sido a causa de retardo mental não-sindrômico (MRX46).

### Gene FMR1, Xq27.3

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon FMR1	Sítio de ligação NM_002024.4	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	190-192		
166	02927-L03721	Éxon 9	1019-1020	AAAAGCTAGAAG-CTTTCTCGAATT	12.9 Kb
142	02928-L03720	Éxon 16	1867-1868	ACTCCCGAACAG-ATAATCGTCCAC	556 kb para o gene AFF2

Alterações no gene FMR1 causam a síndrome do X-Frágil, caracterizado por retardo mental moderado à severo. Expansões de trinucleotídeos são as alterações mais frequentes neste gene. Estas expansões causam metilação do promotor e inativação do gene FMR1.

- ME029FMR1/AFF2: contém mais sondas para FMR1

### Gene AFF2 (FMR2), Xq28

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon AFF2	Sítio de ligação NM_002025.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	480-483		
154	03511-L04202	Éxon 1	501-502	TCGACTTTTTCA-GAGACTGGGACT	161.1 Kb
283	00493-L00066	Éxon 3	978-979	GTCATAACCCTA-GCACTGTACTGG	175.5 kb
241	03516-L5823	Éxon 5	1604-1605	CTCACTTCCATG-CATACTGCTGGA	118.4 Kb
337	02932-L02323	Éxon 11	2537-2538	GAACCAAGACCT-AACATCCCTTTG	31.1 Kb
261	02933-L14362	Éxon 29	4128-4129	CAGTGTCTCTCA-ACAACGTCTCCC	4733 Kb para o gene SLC6A8

Similar ao gene FMR1, expansões de trinucleotídeos causam inativação deste gene, que está associado a retardo mental, falha ovariana precoce e transtorno compulsivo-obsessivo.

- ME029 FMR1/AFF2: contém mais sondas para AFF2

**Gene SLC6A8, Xq28**

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon SLC6A8	Sítio de ligação NM_005629.3	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	279-281		
208	01871-L15827	Éxon 4	853-854	AGACTGTGCCAA-TGCCAGCCTGGC	2.5 Kb
301	01876-L01445	Éxon 9	1448-1449	ATCGCCTACCCG-CGGGCTGTCACG	706 kb para o gene GDI1

Mutações no gene SLC6A8 causam MRX.

- P049 SLC6A8: contém mais sondas para SLC6A8

**Gene GDI1, Xq28**

Comprimento (nt)	Sonda SALSA	Éxon GDI1	Sítio de ligação NM_001493.2	Sequencia parcial (24 nt adjacente do sítio de ligação)	Distância para a próxima sonda
		<i>startcodon</i>	343-345		
136	02916-L04199	Éxon 1	347-348	CCTGACCATGGA-CGAGGAATACGA	3.9 Kb
378	02917-L02311	Éxon 7	1117-1118	TGGATGACATCA-TCATGGAGAACG	

GDI1 é um gene pequeno de 6 Kb. As mutações neste gene podem causar retardo mental

## ANEXO II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Dados de identificação

**Título do Projeto:** Diagnóstico molecular da Síndrome do X-Frágil

**Pesquisadores Responsáveis:** Aparecido Divino da Cruz, Daniela de Melo e Silva e Fernanda Carla Stegani

#### 1. Maiores de 18 anos e plenamente capazes de manifestar o seu consentimento

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_, Nacionalidade \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_,  
Endereço \_\_\_\_\_ estou  
sendo convidado a participar de um estudo denominado: Diagnóstico molecular da Síndrome do X-Frágil, cujos objetivos e justificativas são: validar o diagnóstico Genético-Molecular de pacientes com suspeita da Síndrome do X-Frágil (SXF) no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, pela técnica de MLPA, visto que o diagnóstico de um paciente com a Síndrome do X-Frágil estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e portadores, e de realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos. Possibilitando assim, um tratamento específico diminuindo o impacto econômico, social e pessoal que esta síndrome acarreta.

Os critérios de inclusão são: pacientes encaminhados ao Núcleo de Pesquisas Replicon, com suspeita de Síndrome do X-Frágil maiores de 18 anos, que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), ou menores, caso seus responsáveis também concordarem com a pesquisa e assinarem o TCLE.

Os critérios de exclusão são: pacientes com suspeita de Síndrome do X-Frágil, maiores de 18 anos que não assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, ou menores, cujos responsáveis não aceitarem a participação do (a) filho(a) nesse estudo, ou ainda, pacientes que apresentem outras doenças genéticas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doar voluntariamente, uma amostra de sangue, para colaborar com no diagnóstico de uma alteração genética.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: a confirmação do diagnóstico da Síndrome do X-Frágil ou a exclusão da mesma.

Estou ciente de que existe uma técnica padrão para a realização do diagnóstico da SXF, porém não será utilizada, pois apresenta menor especificidade, requer maior tempo e custo comparada à técnica proposta e que será utilizada.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta de sangue você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha, podem também ocorrer a formação de hematomas que não são incomuns, caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado (a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são : Aparecido Divino da Cruz, Daniela de Melo e Silva e Fernanda Carla Stegani, e com eles poderei manter contato pelos telefones: 39461443/ 3946 1086 (Aparecido); 812999-66/32185836 (Daniela), 991446 68/3215 3091 (Fernanda).

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa

Pesquisadora Fernanda Carla Stegani

---

Pesquisadora Daniela de Melo e Silva

---

Pesquisador Aparecido Divino da Cruz

**2. Maiores de 18 anos, porém sem condições de manifestar o seu consentimento (perturbações mentais ou estados de inconsciência) ou menores de 16 anos (pais ou tutores)**

Nome (sujeito da pesquisa), \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_, Nacionalidade \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_,  
Endereço \_\_\_\_\_ Neste  
ato representado por mim:

Nome do representante legal \_\_\_\_\_  
Nacionalidade \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Estado Civil \_\_\_\_\_  
Profissão \_\_\_\_\_ Endereço \_\_\_\_\_.

Grau de parentesco com o sujeito da pesquisa \_\_\_\_\_  
está sendo convidado a participar de um estudo denominado: Desafios na avaliação Genético-Molecular de pacientes com suspeita da Síndrome do X- Frágil atendidos na Rede Pública de Saúde do Estado de Goiás, cujos objetivos e justificativas são: Validar o diagnóstico Genético-Molecular de pacientes com suspeita da Síndrome do X-Frágil (SXF) no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, pela técnica de MLPA, visto que o diagnóstico de um paciente com a Síndrome do X-Frágil estabelece uma oportunidade valiosa de fazer estudos na família, identificando outros afetados e portadores, e de realizar um aconselhamento genético eficiente permitindo a prevenção de novos casos. Possibilitando assim, um tratamento específico e diminuindo o impacto econômico, social e pessoal que esta síndrome acarreta.

A sua participação no referido estudo será no sentido de doar voluntariamente, uma amostra de sangue, para colaborar com o diagnóstico de uma alteração genética.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, é possível esperar alguns benefícios para o meu representado, tais como a confirmação do diagnóstico da Síndrome do X-Frágil ou a exclusão da mesma.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Caso, durante a coleta de sangue, ocorra a formação de hematomas, o sujeito da pesquisa será imediatamente encaminhado (a) ao Serviço Médico da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Estou ciente de que a sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o (a) identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que pode haver recusa à participação no estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são : Aparecido Divino da Cruz, Daniela de Melo e Silva e Fernanda Carla Stegani, e com eles poderei manter contato pelos telefones: 39461443/39461385, 812999-66/32185836, 991446-68/32153091, respectivamente.

É assegurada a assistência do meu representado durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação do meu representado.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, autorizo a participação de (nome do sujeito da pesquisa) \_\_\_\_\_ na referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira,

caso ocorra qualquer dano decorrente da participação no estudo, este será reparado, conforme determina a lei.

Goiânia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura e RG do representante legal do sujeito da pesquisa

---

Pesquisadora Fernanda Carla Stegani

---

Pesquisadora Daniela de Melo e Silva

---

Pesquisador Aparecido Divino da Cruz

### **3. Menores entre 16 anos completos e 18 anos incompletos (pais ou tutores)**

A Resolução 196/96 exige que os representantes legais (que são somente os pais ou os tutores) assinem. No entanto, a própria Resolução dispõe sobre a necessidade de que os esclarecimentos sejam dados, também, ao menor, considerando a sua capacidade de entendimento. Sugere-se, portanto, que seja utilizado o TCLE dos maiores e capazes (item 1), e que os pais ou os tutores assinem, em conjunto, com o menor, pois, entre 16 anos completos e 18 anos incompletos, o menor é apenas assistido (acompanhado) e não representado.

## Anexo III



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário  
Cidade Postal 85 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3246.1070 • Fax: (62) 3246.1270  
www.pucgoias.edu.br • prore@pucgoias.edu.br

## DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o **Diagnóstico molecular da Síndrome do X-Frágil**, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **Fernanda Carla Stegani** foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-SGC/PUC Goiás) sob o **CAAE 0039.0.168.000-10**, em 06/05/2010 e **aprovado** em 15/09/2010.

- CEP-SGC/PUC Goiás pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – item 13).
- Informamos que é obrigatória a entrega do relatório de acompanhamento da pesquisa, conforme a categoria de pesquisa realizada, em cumprimento da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.
- Modelo do relatório de acompanhamento da pesquisa se encontra no site do Comitê de Ética <http://www.pucgoias.edu.br/cep> - modelos documentos.

**Categorias de pesquisa**

TCC: Final da pesquisa  
Especialização: Final da pesquisa  
Mestrado: Relatório anual e final  
Doutorado: Relatório anual e final  
Outros: Relatório anual e final

*Rodrigues*  
Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho  
Coordenador do CEP-SGC/PUC Goiás

Goiânia, 15 de setembro de 2010.