



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

**ANDRÉIA PIRES AMANCIO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA  
DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL**

**Goiânia**

**GO – 2013**



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

**ANDRÉIA PIRES AMANCIO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA  
DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL**

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.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Aparecido Divino Cruz, PhD.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva.

**Goiânia**

**GO- 2013**

Amancio, Andréia Pires.  
A484a Análise molecular de pacientes com suspeita da síndrome do  
x-frágil [manuscrito] / Andréia Pires Amancio. – 2013.  
74 f. ; il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás, Departamento de Biologia, 2013.

“Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz”.


1. Síndrome de fragilidade do cromossomo X. 2. Diagnóstico  
molecular. I. Título.

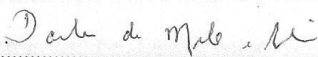
CDU: 575.316(043)

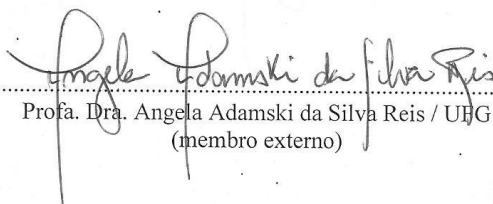
ATA COMPLEMENTAR Nº 69/2012

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DISCENTE: ANDRÉIA PIRES AMANCIO  
DEFENDIDA EM 31 DE JANEIRO DE 2013 E APROVADA COM CONCEITO A

BANCA EXAMINADORA

  
.....  
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz  
(presidente-orientador)

  
.....  
Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva / PUC Goiás  
(membro interno)

  
.....  
Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis / UFG  
(membro externo)

## **Agradecimentos**

À Deus, por ter me permitido a vida e me concedido, saúde e perseverança necessária para que pudesse me orgulhar diante de cada queda e luta pelos meus objetivos;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho.

Especiais ao meu orientador, Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz, coordenador do Núcleo de Pesquisas Replicon, do Depto de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelo incentivo, paciência, oportunidades e ensinamentos para a conclusão desse trabalho;

À minha família por tudo que fizeram e fazem por mim, e que tornaram esse sonho possível. Amo vocês.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Melo e Silva pelo apoio, incentivo e ajuda técnica.

Um especial agradecimento às Profas. Caroline Oliveira Araújo Melo, Fernanda Carla Stegani e Fernanda Cabral; ao técnico do laboratório Aldaires Melo Vieira e à bióloga Damiana Mirian da Cruz e Cunha pela receptividade no laboratório, presteza em ajudar, sem o qual esse projeto não teria sido concluído, meu muito obrigada!

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

Aos amigos de turma, especialmente Brenda Brandão e Fernanda Ribeiro Godoy que compartilharam as dificuldades e alegrias enfrentadas nesses anos, vocês são inesquecíveis.

Aos pacientes e seus familiares pela participação nesse estudo.

A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta colaboraram na realização e conclusão desse trabalho, minha eterna gratidão e reconhecimento.

Muito Obrigado

## RESUMO

A Deficiência Mental (DM) é definida como sendo um nível incompleto do desenvolvimento intelectual, e sua manifestação ocorre normalmente antes dos 18 anos de idade. É um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns, com uma prevalência de 5% na população brasileira. A síndrome do X-Frágil (SXF) é a causa mais comum de retardo mental hereditário em todo o mundo, e a segunda causa genética mais frequente de deficiência mental. O fenótipo da SXF está associado a mutações no gene *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation type 1*), que é causada pela expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos (CGG) na região reguladora do gene *FMR1*, localizado no cromossomo X (Xq27.3). A importância do reconhecimento clínico e diagnóstico específico da SXF vem do fato de que teoricamente todos os casos são hereditários e familiares. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo validar o diagnóstico genético-molecular simplificado e de baixo custo, para 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, utilizando a técnica de PCR. Foram selecionados 35 pacientes encaminhados pelo serviço médico da rede pública de saúde ao LaGene com indicação clínica de diagnóstico da SXF. O DNA desses pacientes foi extraído e submetido a dois métodos de PCR, aqui denominados PCR de Triagem (PCR-T) e PCR para Pré-mutação (PCR-P). A nova metodologia, PCR-T, produziu 88% de resultados conclusivos contra 100% de conclusividade pela técnica padrão (PCR-P) e obtendo um  $p > 0,11$ . Os alelos amplificados pela PCR-P possibilitou o diagnóstico de pré-mutação em uma amostra. A partir destas observações propõe-se uma estratégia para o diagnóstico da síndrome utilizando a PCR-P na pesquisa de pré-mutação em pais de indivíduos com resultados inconclusivos. Considerando os resultados bem sucedidos e aprimorados da técnica de PCR, incluindo o novo e fácil diagnóstico da pré-mutação de amostras não concluídas pela técnica de triagem, sugere-se a implementação de ambas as PCR no laboratório de genética do Estado de Goiás (LaGene) para o diagnóstico da SXF.

**Palavras-chave:** Síndrome X-Frágil, diagnóstico molecular, gene *FMR1*, PCR.

## ABSTRACT

The Intellectual Disability (DM) is defined as an incomplete level of intellectual development, and its manifestation usually occurs before 18 years of age. It is one of the most common neuropsychiatric disorders, with a prevalence of 5% in our population. The Fragile X syndrome (FXS) is the most common cause of inherited mental retardation worldwide, and the second most common genetic cause of mental retardation. The phenotype of FXS is associated with mutations in FMR1 (Fragile X Mental Retardation-linked type 1), which is caused by the expansion of repetition of a trinucleotide sequence (CGG) in the regulatory region of the FMR1 gene, located on chromosome X (Xq27 .3). The importance of clinical recognition and specific diagnosis of FXS comes from the fact that theoretically all cases are hereditary and familial. In this context, this study aimed to validate the molecular genetic diagnosis simplified and cost, for patients suspected of FXS in the Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics (LaGene) of the Department of Health of the State of Goiás in Goiânia using the PCR technique. We selected 35 patients referred by medical service of public health to LaGene with clinical indication for diagnosis of FXS. The patients' DNA was extracted and subjected to two PCR methods, here called PCR Screening (PCR-T) and PCR for Pre-mutation (PCR-P). The new methodology, PCR-T, 88% produced conclusive results against 100% conclusiveness of the standard technique (PCR-P) and getting a  $p > 0.11$ . The alleles amplified by PCR-P allowed the diagnosis of pre-mutation in a sample. From these observations we propose a strategy for the diagnosis of the syndrome using PCR-P research in pre-mutation individuals in parents with inconclusive results. Given the successful results and improved the PCR, including the new and easy diagnosis of pre-mutation samples not completed by the technique of drawing, we suggest the implementation of both PCR genetics laboratory in the State of Goiás (LaGene ) for the diagnosis of FXS.

**Keywords:** Fragile X Syndrome, molecular diagnostics, gene FMR1 PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ideograma do cromossomo x indicando a localização no braço longo. O esquema linear do gene FMR1 indica a quantidade de éxons e a localização da sequência de trinucleotídeos CGG susceptível à expansão que resulta nas categorias normal, zona cinza, pré-mutação e mutação completa..... 20
- Figura 2: Representação esquemática do gene *FMR1*. Os 17 éxons simbolizados pelos quadrados que aparecem numerados. As regiões em branco representam as sequências não traduzidas, em 5'UTR e 3'UTR que não refletem o tamanho relativo dos éxons. A região promotora está indicada em preto na extremidade 5' do gene.....22
- Figura 3: Ideograma do cromossomo X indicando a co-localização dos sítios frágeis observados na extremidade distal do braço longo do cromossomo X em humanos. O sítio fraxa está associado a SXF. . 26
- Figura 4: Risco de expansão em mulheres portadoras da pré-mutação para a mutação completa segundo seu número de trinucleotídeos CGG por geração no gene *FMR1* ..... 29
- Figura 5: Imagem de cromossomos X metafásicos mostrando estrutura cromossômica normal e com o sítio frágil na região Xq27.3. .... 32
- Figura 6: Local de anelamento dos iniciadores C, 2, e F no gene FMR1 estão sublinhado, e as repetições CGG estão grifados.....39
- Figura 7. Influência da técnica de PCR para pré-mutação (PCR-P) em comparação com a PCR de triagem (PCR-T) no diagnóstico de pacientes com indicação clínica para síndrome do X frágil. O número de diagnósticos conclusivos e inconclusivos, para todos os pacientes analisados, é mostrado através de barras horizontais.....45
- Figura 8: Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-T em gel de poliacrilamida..... 49
- Figura 9: Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-P em gel de poliacrilamida..... 50
- Figura 10: Fluxograma proposto para protocolo de diagnóstico laboratorial da SXF em mulheres com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome. .... 53
- Figura 11: Fluxograma proposto para protocolo de diagnóstico laboratorial da SXF em homens com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome..... 54



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens de métodos para diagnóstico laboratorial da SXF.....	17
Tabela 2: A sequência de bases dos oligonucleotídeos e indicadores utilizados na amplificação dos alelos do gene FMR1 pelas técnicas de PCR-T e PCR-P para diagnóstico de pessoas com indicação clínica para a SXF em Goiânia-GO .....	40
Tabela 3: Representação do tamanho dos fragmentos esperados após as técnicas de PCR-T e PCR-P .....	42
Tabela 4: Distribuição percentual da frequência e amostras de propósitos com indicação clínica de SXF quanto ao sexo .....	44
Tabela 5: Número de pacientes com diagnóstico conclusivo e sua distribuição nos grupos classificatórios (não-afetado, zona-gray, e pré-mutado). Dados comparativos as técnicas de PCR-T e PCR-P .....	47

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- AAIDD: *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (Associação Americana de disfunções intelectuais e desenvolvimentais)
- AGG: Adenina-guanina-guanina
- CEP: Comitê de ética em pesquisa
- CGG: Citosina-guanina-guanina
- CID: Classificação internacional de doenças
- CpG: Ilha rica em citosina e guanina
- DI: Deficiência intelectual
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- 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
- 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

µL: Microlitros

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

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)

PCR-P: Reação em cadeia da Polimerase – Pré-mutação

PCR-T: Reação em cadeia da Polimerase - Triagem

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 Objetivos.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Objetivo geral .....	18
1.2.2 Obejtivos específicos .....	18
<b>2 A SÍNDROME DO X-FRÁGIL .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 O gene <i>FMR1</i> e a proteína FMRP .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Sítios frágeis no cromossomo X.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Características clínicas da SXF.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Herança e Padrão de Transmissão da SXF (repetições de CGG).....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Diagnóstico da SXF.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Análise Citogenética .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Teste de Imunocitoquímica e Imunohistoquímica.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8 <i>Southern Blotting</i> – RFLP.....</b>	<b>33</b>
<b>2.9 PCR .....</b>	<b>33</b>
<b>2.10 Sequenciamento .....</b>	<b>35</b>
<b>2.11 MLPA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.12 Aconselhamento Genético .....</b>	<b>36</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Casuística.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Extração e Quantificação do DNA genômico .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 PCR Reação em Cadeia da Polimerase .....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Amplificação da sequência alvo por PCR-T .....	40
3.3.2 Amplificação da sequência alvo por PCR-P .....	40
3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	41
<b>3.4 Análise estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Variação no númro de repetições de CGG das amostras analisadas em duplicata pela técnica de PCR-T e PCR-P .....</b>	<b>48</b>

<b>4.2 Interpretação e visualização dos produtos da amplificação da PCR-T e PCR-P em gel de poliacrilamida.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Proposta de estratégia para diagnóstico laboratorial da SXF .....</b>	<b>51</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>56</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO I</b>	
<b>DECLARAÇÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO II</b>	
<b>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>68</b>

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 Introdução

A deficiência mental (DM) é considerada um estado incompleto ou inibido de desenvolvimento do intelecto e sua manifestação ocorre antes dos 18 anos de idade. Ela representa um dos grandes desafios da sociedade contemporânea, sendo a redução da qualidade de vida, um dos principais fatores. Para os gestores públicos, a DM deve ser considerado um problema de saúde pública devido à sua prevalência alta, e grande parte dos casos terem sua origem genética. Em geral, para a população, a deficiência impõe consequências negativas para a produtividade e as relações sociais causando transtornos e constrangimentos desnecessários aos pacientes e suas famílias (GALVAN & GALVEZ, 2012).

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 definido a partir dos critérios de diagnóstico. Já o DSM-IV(2003), do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 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 (DSM-IV, 2003).

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* (AAIDD, 2010) escolheu deficiência intelectual como o preferível. 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 e funcional de deficiência intelectual, adicionando sucessivas

inovações e reflexões teóricas e empíricas em relação aos seus modelos anteriores (CARDOZO e SOARES, 2011).

No Brasil, segundo dados do Censo Demográfico de 2010, existem ao menos 45 milhões de pessoas com pelo menos uma forma de deficiência intelectual ou física, representando, aproximadamente, 24% da população. Dentre os afetados, em torno de 12,7 milhões (ou 6,7% da população residente) seriam deficientes intelectuais. Os dados nacionais provavelmente encontram-se subestimados, porém os números atuais são suficientes para incluir a DM como um problema de saúde pública (IBGE. 2012).

Para o indivíduo e sua família, a DM representa limitação em diferentes graus, em geral determinando necessidade de supervisão, suporte e proteção permanente. Para os gestores públicos, a DM é considerada um problema de saúde pública devido à sua prevalência alta. Em geral, para a população a DM impõe consequências negativas para a produtividade e as relações sociais causando transtornos e constrangimentos desnecessários aos pacientes e suas famílias (VASCONCELOS, 2004).

A síndrome do X-Frágil (SXF) é a forma mais comum de retardo mental (RM) herdado. A SXF inclui cerca de 30% de todos os casos de RM. (RUIZ *et al.*, 2009). Esta síndrome é uma doença genética, que se manifesta pelos distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo dificuldades de aprendizagem, problemas comportamentais e distúrbios invasivos do desenvolvimento, autismo e correlatos (HALL *et al.*, 2009). 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: 4.000 para o sexo masculino e 1: 6.000 para o sexo feminino (LIANG *et al.*, 2008). A SXF apresenta 80% de penetrância nos homens, e 30% de penetrância nas mulheres. Os homens portadores passam para as suas filhas, que herdam a pré-mutação e não são afetadas, mas os filhos do sexo masculino poderão ser afetados (RUIZ *et al.*, 2009). Este padrão é chamado de paradoxo de Sherman, sendo um exemplo peculiar de herança genética (BOURGEOIS *et al.*, 2009).

A expansão da repetição de uma seqüência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), situado na região

terminal do cromossomo X (Xq27.3), é considerada a causa da doença. Os indivíduos afetados apresentam mais de 200 repetições de CGG, normalmente acompanhadas de metilação, o que leva à repressão da transcrição do gene e ausência da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). A FMRP é o produto final do gene, que pode estar presente em diferentes isoformas. Os sintomas característicos da síndrome parecem estar sempre associados à deficiência da proteína (STÖGER *et al.*, 2011).

Mulheres afetadas pela SXF, por possuírem dois cromossomos X, podem produzir FMRP a partir do cromossomo X normal e, quando apresentam comprometimento intelectual, os sintomas são brandos e a deficiência mental é leve. Já os homens com mutação completa podem apresentar alguns alelos desmetilados, nesse caso conhecido como mosaicismo para metilação. Existem também homens mosaicos para pré-mutação, seus sintomas são menos severos que aqueles pacientes que possuem exclusivamente a mutação completa, que também apresentam níveis de severidade variáveis. (HAGERMAN e HAGERMAN, 2010).

Os portadores da SXF apresentam um perfil comportamental que é semelhante, em alguns aspectos, aos pacientes com autismo. Entretanto, a maioria dos pacientes não preenche todos os critérios necessários para o diagnóstico de autismo (BOURGEOIS *et al.*, 2009). Outros problemas de comportamento são frequentemente observados, incluindo hiperatividade com ou sem déficit de atenção, irritabilidade, agressividade, resposta anormal aos estímulos, principalmente hipersensibilidade aos sons (RUIZ *et al.*, 2009).

A epilepsia na SXF tem sido descrita em vários estudos, com prevalência entre 13% a 45%. O período de início das crises varia entre dois a nove anos de idade. As crises mais frequentes são crises parciais simples ou complexas. Em geral, os portadores respondem ao tratamento com as drogas antiepilépticas convencionais, atingindo controle total das crises (HAGERMAN *et al.*, 2009). A SXF não tem cura, porém existem tratamentos paliativos.

Estudos sobre a terapia genética podem possibilitar a inserção no cromossomo X de um gene perfeito substituindo o gene FMR 1 alterado (BOURGEOIS *et al.*, 2009).



Várias das características observadas na SXF só se tornam evidentes após a puberdade. Face alongada, prognatismo, fronte grande e quadrangular, macrocefalia, orelhas grandes ou de abano e macroorquidia são os sinais fenotípicos mais frequentes e, pelo menos um deles, está presente em 80% dos pacientes pós-púberes (VEIGA e TORALLES, 2002).

A técnica padrão de laboratório para o diagnóstico da SXF é a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Porém outras metodologias também podem ser exploradas, como a análise cromossômica, a investigação da presença ou ausência da metilação do gene, ou até mesmo o sequenciamento do DNA. Como existem diversas técnicas e todas apresentam vantagens e desvantagens, elas devem ser escolhidas dependendo das características clínicas de cada paciente e seu histórico familiar. A Tabela 1 indica as vantagens e desvantagens de cada técnica (STEGANI, 2011)

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

Método	Vantagens	Desvantagens
Cariótipo	Analisa os cromossomos, permitindo a identificação das estruturas, anormalidades estruturais e o sítio frágil.	Risco de resultado falso negativo; Não diferencia FRAXA de FRAXE; Não detecta portadores; Não identifica mutação pontual.
<i>Southern Blotting</i>	Permite o diagnóstico para homens e mulheres, incluindo portadoras.	Alto custo; Requer grande quantidade de DNA de alta qualidade; Indisponibilidade comercial de sondas.
PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	Resultado rápido; Utiliza pequena amostra de DNA; Detecção de zona gray.	Confirmação apenas para SXF em homens; Risco de resultado inconclusivo; Risco alto de não detectar portadores; Não identifica mutação pontual.
Sequenciamento	Identifica mutações de ponto; Confiável para homens e mulheres;	Alto custo; Pessoal altamente qualificado.
MLPA ( <i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i> )	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), com modificações.

O exame para diagnóstico da SXF é um dos mais solicitados entre os testes de pesquisa de doenças genéticas (STEINER *et al.*, 2005) e a disponibilidade de uma triagem aprimorada beneficia muitos pacientes. O diagnóstico rápido e correto, aliado ao estímulo e tratamento precoce tem grande influência no prognóstico dos pacientes portadores da SXF. Além disso, 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, incluindo

o diagnóstico pré-natal, que reduziria o risco de recorrência com consequente diminuição de custos institucionais de saúde pública (BHOGAL e JONGENS, 2010).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo geral**

- Propor um protocolo de diagnóstico genético-molecular simplificado, de baixo custo e específico para pacientes com suspeita médica de diagnóstico de Síndrome do X-Frágil (SXF).

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar um protocolo molecular para o diagnóstico da Síndrome do X-Frágil (SXF) no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás;
- Avaliar o potencial da técnica de PCR como um método de triagem de pacientes com suspeita da Síndrome do X-Frágil (SXF);
- Contribuir no atendimento da saúde genética da população, proporcionando um diagnóstico genético a indivíduos com suspeita de SXF.

## 2. A SÍNDROME DO X-FRÁGIL

A Síndrome do X Frágil (SXF) é um distúrbio hereditário que causa retardo mental e foi reportada pela primeira vez em 1943 por Martin e Bell em uma família com retardo mental ligado ao cromossomo X (MARTIN e BELL, 1943). Indivíduos afetados pela SXF possuem um comprometimento da saúde mental variável, que pode ir desde uma dificuldade no aprendizado até um retardo mental severo. Inicialmente conhecida pelo nome dos autores, Síndrome de Martin-Bell, a SXF foi assim denominada devido à observação de um sítio frágil no cromossomo X. Adicionalmente, 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).

Do ponto de vista genético, a SXF é uma doença monogênica, de herança recessiva ligada ao X, que causa um distúrbio do neurodesenvolvimento, devido a inativação do gene chamado *FMR1* (*Fragile X-linked Mental Retardation Type 1*), localizado no Xq27.3. A região do promotor *FMR1* 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, durante o empacotamento do cromossomo X metafásico aparece com uma constrição distal em seu braço longo. Esta região também é sujeita a quebras frequentes (ZEIER *et al.*, 2009). O gene *FMR1* contém 38 quilobases (Kb) e 17 éxons (BIACSI *et al.*, 2008). E, é transcrito em 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 *FMR1* em humanos revelou um total de 185.775 pares de bases em sua constituição (COLLINS *et al.*, 2010).

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 1, mostra o número de repetições no promotor do gene, de acordo com as categorias relatadas acima.

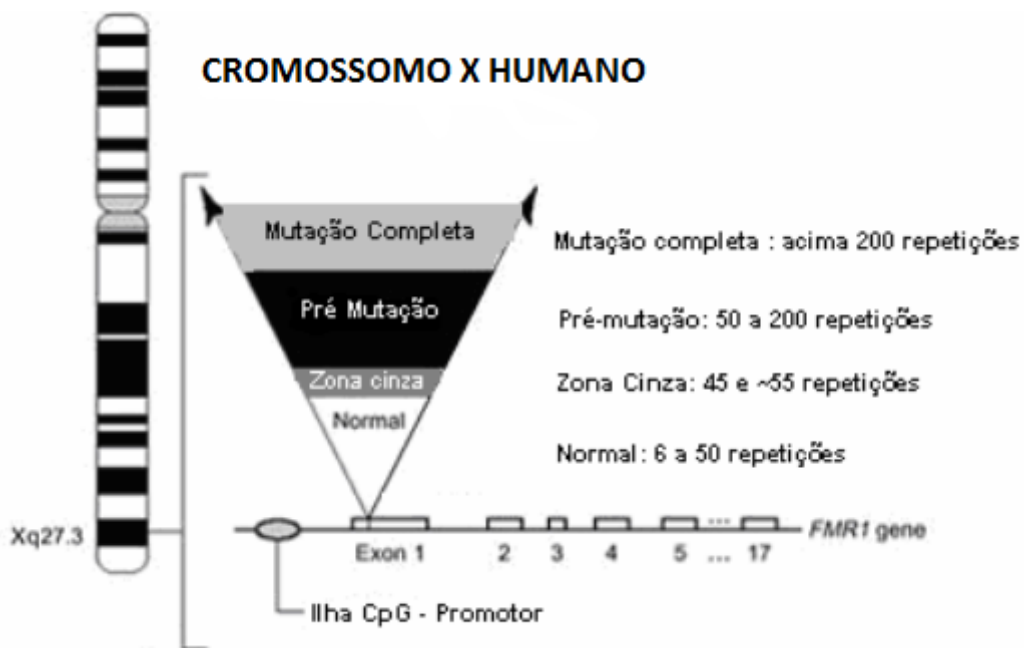


Figura 1: Ideograma do cromossomo X indicando a localização no braço longo. O esquema linear do gene *FMR1* indica a quantidade de éxons e a localização da sequência de trinucleotídeos CGG susceptível á expansão, que resulta nas categorias normal, zona cinza, pré-mutação e mutação completa.

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

O número de repetições CGG que oscila entre 45 e 55 podem apresentar-se estável em algumas pessoas, mas, em outras, tende 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*), cujo risco relativo associado a manifestação da doença na família não pode ser desprezado (ARRIETA *et al.*, 2008). Por outro lado, os pacientes, portadores das repetições compreendidos na zona cinzenta, podem desenvolver deficiências como distúrbio de aprendizado e comportamento, apesar da mutação gerar um fragmento

contendo um número de CGG próximo do esperado em indivíduos não afetados (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).

Com o passar dos anos, percebeu-se que portadores da pré-mutação também têm risco de desenvolver uma doença neurodegenerativa progressiva que tem sintomas e sinais clínicos inteiramente distintos da SXF (OOSTRA WILLEMSSEN, 2009). Essa síndrome foi denominada Síndrome de Tremor e Ataxia associada ao X frágil (FXTAS), em que indivíduos com mais de 50 anos, portadores de pré-mutação no gene *FMR1* têm probabilidade maior de desenvolver quadros clínicos neurodegenerativos de início tardio (JACQUEMONT *et al.*, 2004).

O fenótipo de FXTAS foi primeiramente identificado em 2001, em cinco casos de homens portadores da pré-mutação no gene *FMR1* que apresentaram tremor de início entre 50 e 60 anos de idade. Esses indivíduos apresentavam tremor, discinesia branda, dificuldade para andar, escrever, manusear talheres, e rigidez facial (HAGERMAN *et al.*, 2001). E em 2004 foram relatadas cinco mulheres portadoras da pré-mutação que apresentavam sintomas e sinais de FXTAS, porém mais brandos, possivelmente, devido ao mecanismo de inativação do cromossomo X.

Nas mulheres, a pré-mutação pode também estar associada a falência ovariana prematura (FOP) e menopausa precoce antes dos 40 anos de idade, apresenta em 20% das portadoras (HUNDSHEID *et al.*, 2000).

## **2.1 O gene *FMR1* e a proteína FMRP**

O gene *FMR1* localizado no Xq27.3, é altamente conservado do ponto de vista evolutivo, distribuídos em 17 éxons e 16 íntrons e apresenta em sua região 5' não traduzida (5'UTR) um microssatélite de trinucleotídeos CGG. Este microssatélite

de trinucleotídeos apresenta polimorfismo de tamanho na população geral, que varia de 6 a 55 repetições CGG, sendo os alelos mais frequentes com 28, 29, e 30 repetições. (COLLINS *et al.*, 2010; GOMEZ, 2011).

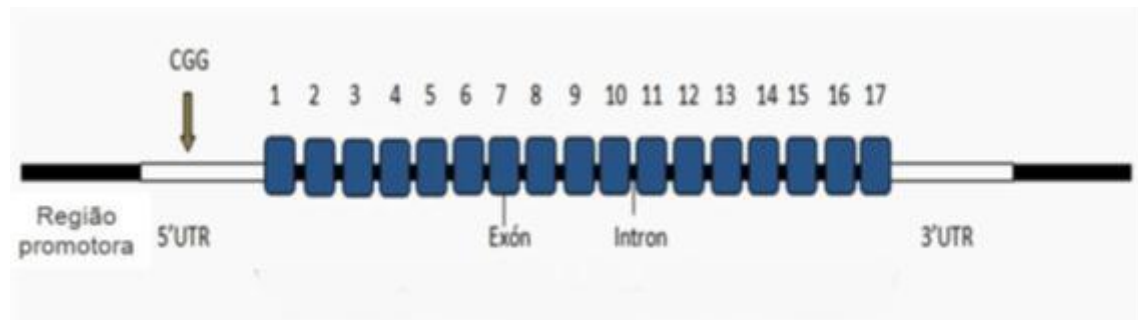


Figura 2: Representação esquemática do gene *FMR1*. Os 17 éxons simbolizados pelos quadrados que aparecem numerados. As regiões em branco representam as sequências não traduzidas, em 5'UTR e 3'UTR que não refletem o tamanho relativo dos éxons. A região promotora está indicada em preto na extremidade 5' do gene.

Fonte: GOMEZ, 2011. Com modificações.

A mutação mais frequente 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 6 e 50 cópias CGG é considerado um indivíduo não afetado, a instabilidade gerada resulta em expansão da repetição. De 45 a 55 repetições constituem a segunda classe alélica, algumas vezes categorizada como protomutados, amplamente conhecida 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, que impede a produção da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) (QUEIROZ, 2007).

As mutações completas são mitoticamente instáveis, determinando a ocorrência de mosaicismos, que significa que há presença no mesmo indivíduo de uma população de células com a mutação completa e outra de pré-mutação, sendo estabelecido precocemente, durante a embriogênese (ARRIETA *et al.*, 2008).

O mosaicismos 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).

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).

Em células provenientes de indivíduos normais, a região do gene *FMR1* que contém as repetições de CGG está associada com histonas acetiladas, mas a acetilação é reduzida em células com a mutação completa metilada (MCCARY & ROBERTS, 2012). Noventa e oito por cento dos casos da SXF são causados pela expansão de CGG. No entanto, deleções e mutações de ponto no gene *FMR1* também podem causar a síndrome, mas são eventos raros (HALLAHAN *et al.*, 2012). 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 interferem 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<sup>1</sup> 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 transcrito gerado pelo gene *FMR1* é a proteína FMRP, essa proteína está amplamente expressa em tecidos humanos e de camundongo. Testes de hibridização *in situ* revelaram, em tecidos de camundongos adultos expressão abundante da proteína no cérebro, testículos, ovário, epitélio esofágico, olho e baço. Foi observada expressão moderada no útero, tireoide e fígado. A ausência da expressão de *FMR1* foi relatada no coração, aorta e músculos (RODRIGUEIRO, 2006).

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 transita dentro e fora do núcleo celular além de possuir atividades relacionadas a RNAs diversos, predizendo sobre o fenótipo pleiotrópico da SXF (GOLDLER *et al.*, 2010).

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).

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. Estas tétrades se caracterizam por guaninas que se ligam por pontes de hidrogênio formando uma estrutura quadrangular. Como aproximadamente 4% dos genes expressos no cérebro de fetos humanos, transcrevem mRNAs cujas sequências favorecem a formação de tétrades, é possível que a FMRP interaja com um grande número de mRNAs produzidos nos tecidos cerebrais. (TAN *et al.*, 2009).

Essa proteína está envolvida no desenvolvimento e função normais do cérebro, com papel essencial tanto na função sináptica como no crescimento dos dendritos. Embora a função exata da FMRP ainda não seja totalmente esclarecida, suas atividades podem estar relacionadas ao trânsito nuclear-citoplasmático de RNA, controle de tradução, transporte de RNA nos dendritos, tradução e regulação dendrito-específico (RIFE *et al.*, 2003).

## **2.2 Sítios frágeis no cromossomo X**

A denominação “Síndrome do X Frágil” foi alcunhada em referência às observações iniciais do cromossomo X nos cariótipos dos portadores, que exibiam uma constrição secundária no braço longo, que se assemelhava a uma quebra cromossômica neste local. Posteriormente, dados moleculares demonstraram a presença da expansão de CGG no gene *FMR1*. A região gênica foi denominada de sítio FRAXA. Adicionalmente, outros sítios frágeis presentes no cromossomo X humano já foram descritos: FRAXD, FRAXE e FRAXF. O FRAXE está relacionado a uma mutação no gene *FMR2*, região Xq28, e contém uma repetição de trinucleotídeos (CCG)<sub>n</sub> instável, cuja expansão também é responsável pelo fenótipo de retardo mental. O sítio FRAXF que não causa, aparentemente, qualquer fenótipo anormal, também está localizado na região Xq28, onde foi identificada a presença de repetições de GCC; o FRAXD também não está associado a manifestações clínicas aparentes, sendo localizado na região Xq27.2, posição muito próxima ao sítio FRAXA em Xq27.3 (Figura 3). A presença destes sítios frágeis localizados em regiões muito próximas no cromossomo X e co-localizados ao FRAXA pode dificultar a interpretação e análise citogenética dos portadores da SXF (QUEIROZ, 2006; GOMEZ, 2011).

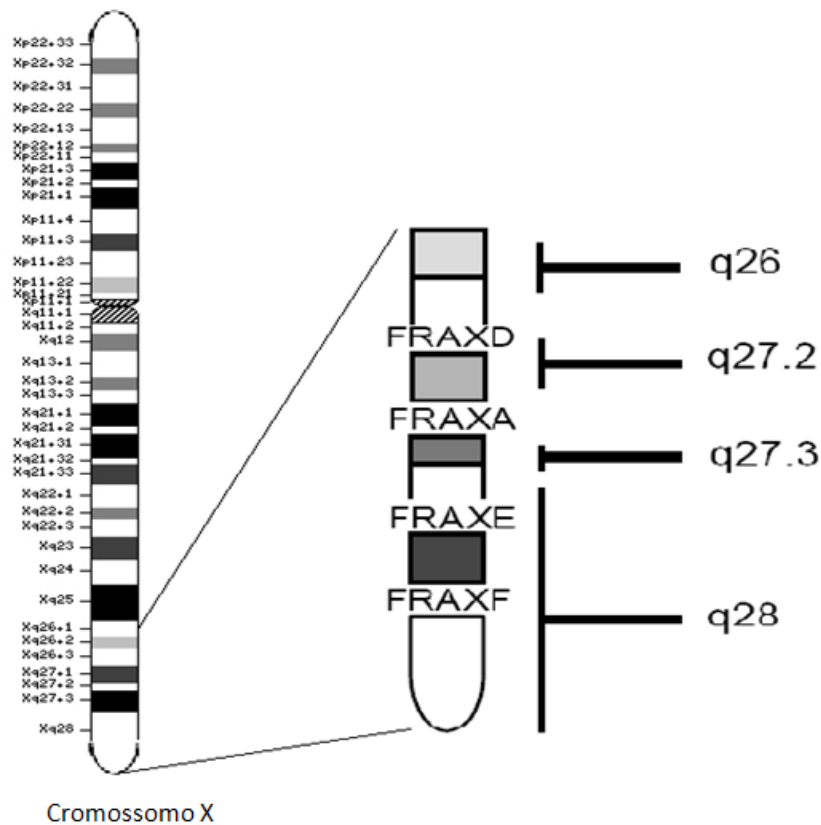


Figura 3. Ideograma do cromossomo X indicando a co-localização dos sítios frágeis observados na extremidade distal do braço longo do cromossomo X em humanos. O sítio FRAXA está associado a SXF.

Fonte: GOMEZ, 2011.

### 2.3 Características clínicas da SXF

As características fenotípicas da SXF normalmente são 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).

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, identificar clinicamente os possíveis portadores da SXF (QUEIROZ, 2007). O atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, reconhecidamente o evento mais frequentemente associado à deficiência intelectual, é a característica clínica mais significativa na SXF (BHOGAL e JONGENS, 2010).

Christofolini e colaboradores (2009) propuseram uma lista para a população brasileira de triagem para a SXF. A lista foi composta por 10 itens, que devem ser observadas pelos profissionais que acompanham o paciente suspeito de ser afetado pela SXF. Os autores sugerem que, além do histórico familiar de deficiência mental, cinco sinais fenotípicos deveriam ser considerados, a saber: face alongada, orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações, macroorquidia, e prega palmar transversa. Adicionalmente, quatro sinais comportamentais: morder as mãos, movimentos rítmicos com as mãos, aversão ao contato físico, e pouco contato visual, também devem ser avaliados. Problemas comportamentais como ansiedade, variação de humor, hiperatividade, e agressividade também podem ser observados em pacientes com SXF.

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 (Quociente de Inteligência) 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).

Em mulheres portadoras da SXF há uma 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).

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).

#### **2.4 Herança e Padrão de Transmissão da SXF (repetições de CGG)**

A transmissão da repetição de CGG é estável em indivíduos normais, sem nenhuma ou com pouca variação no número de repetições de geração para geração. Em geral, a SXF não segue os padrões mendelianos clássicos, porém as mutações encontradas fornecem uma explicação para a herança genética atípica observada para esta doença. Metade dos descendentes de mulheres portadoras de pré-mutação, e todas as filhas e nenhum dos filhos de homens pré-mutados receberão a mutação genética no gene FMR1.

A partir de um determinado número de repetições as sequências tornam-se instáveis favorecendo as expansões e/ou contrações, sendo que as expansões ocorrem com maior frequência na SXF. Essa instabilidade pode ocorrer tanto em células germinais, quanto somáticas e em determinados indivíduos podem exibir uma heterogeneidade somática, tanto ao nível do número de repetições quanto ao seu estado de metilação. Os indivíduos portadores de alelos com graus de metilação e/ou número de repetições CGG diferente nas células somáticas, denominam-se mosaicos (GOMEZ, 2011). Entretanto, o risco de expansão da repetição de CGG de pré-mutação para mutação completa (>200 repetições CGG) na SXF excede as normas tradicionais. A transmissão da mutação completa de mulheres pré-mutadas para sua prole é diretamente correlacionada ao número de repetições de CGG e está acima de 95% em alelos com mais de 100 repetições de CGG (NOLIN *et al.*, 2008). 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).

O mecanismo de instabilidade não está apenas relacionado à extensão do alelo, ela também apresenta uma relação com características estruturais da sequência CGG, como as inserções de AGG. Essas trincas interrompem as repetições CGG, cuja presença e localização também influenciam a estabilidade do alelo impedindo erros durante a replicação (SULLIVAN *et al*, 2002; NOLIN *et al*, 2008). Aproximadamente 70% das grandes expansões têm somente uma unidade AGG, enquanto os alelos normais, são interrompidos por 1 a 3 unidades AGG (MANDEL & BIANCALANA; 2004; VAN ESCH, 2006).

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 cromossômico (SOONTARAPORNCHAI *et al.*, 2008). Assim, os casos afetados pela SXF sempre serão herdados, ou seja, não há possibilidade de se passar de alelo normal para mutação completa tendo obrigatoriamente que passar em uma geração, por uma mulher portadora da pré-mutação. Assim, todos os afetados são necessariamente filhos de mãe ou pai com pré-mutação. Quanto maior o número de repetições CGG da pré-mutação, maior o risco de ocorrer à mutação completa na geração seguinte (Figura 4).

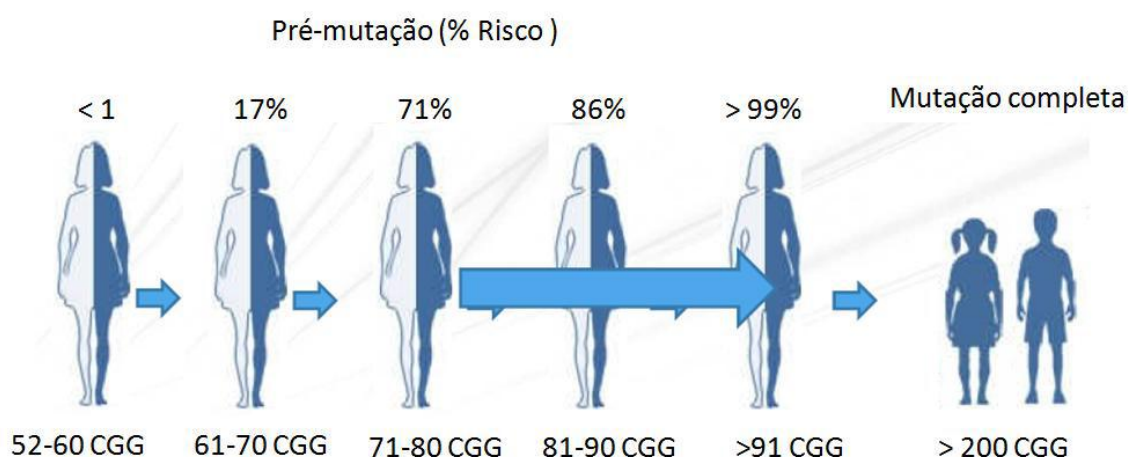


Figura 4. Risco de expansão em mulheres portadoras da pré-mutação para a mutação completa segundo seu número de trinucleotídeos CGG por geração no gene *FMR1*. Fonte: GOMEZ, 2011.

A expansão da pré-mutação para a mutação completa por transmissão paterna é rara. Geralmente os homens transmitem para suas filhas apenas pequenas expansões ou contrações, ou seja, o homem apenas transmite a pré-mutação para suas filhas. Em contrapartida, a expansão mitótica da repetição de CGG é maior nos homens. Por este motivo, os filhos de mulheres portadoras da pré-mutação tem expansões muito maiores que as filhas (POUYA *et al.*, 2009).

Frequentemente a segregação familiar da mutação no gene FMR1 é identificada a partir de uma criança com mutação completa para a SXF, com quadro clínico de retardo mental ou atraso no desenvolvimento. Uma vez confirmada a mutação completa para SXF, recomenda-se proceder a investigação familiar, a identificação de outros portadores da síndrome na família, e subsequentemente, a aconselhamento genético. (Sherman *et al.*, 2005).

## **2.5 Diagnóstico laboratorial da SXF**

O diagnóstico clínico muitas vezes indica o conjunto de sinais e sintomas sugestivos da SXF, apesar da tríade face alongada, orelhas grandes e macroorquidia, presentes em 90% dos casos, apenas sugerirem, mas, não confirmam o diagnóstico (HAGERMAN, 2008).

Como os sinais e sintomas da SXF podem ser semelhantes a outros casos de atrasos e distúrbios gerais de desenvolvimento, é necessária a confirmação do diagnóstico através do exame genético, com técnicas específicas para a síndrome estudada. 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).

Antes da identificação do gene responsável pela SXF, em 1991, seu diagnóstico era realizado por meio do cariótipo. Apesar da possibilidade de identificação de outras alterações cromossômicas numéricas ou estruturais comumente encontradas em indivíduos com DM e outros distúrbios cognitivos, o

cariótipo não é recomendado para o diagnóstico da SXF por apresentar pouca sensibilidade, especificidade baixa, e risco relativo alto para diagnóstico falso-negativo (FRITSCH, 2011).

O conhecimento corrente de genética molecular da SXF deixou mais compreensível à variabilidade do sítio frágil, uma vez que as mutações divergem em uma mesma família. A avaliação molecular do gene *FMR1*, tornou-se o padrão ouro para o diagnóstico apropriado e eficaz da SXF (STEINER *et al.*, 2005). 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 gene *FMR1* (FLORENCIA *et al.*, 2006).

Os diagnósticos disponíveis para a SXF incluem a análise cromossômica ou cariótipo, testes de imunocitoquímica e imunohistoquímica, que fornecem a porcentagem de proteína FMRP nas células e os diagnósticos moleculares por *Southern Blotting*, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Sequenciamento e MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) (YIM *et al.*, 2008)

## **2.6 Análise Citogenética**

A análise citogenética consiste no estudo numérico e morfológico de cromossomos metafásicos e foi o primeiro método laboratorial de diagnóstico descrito para a SXF (Lubs, 1969). Para realização dessa técnica, também chamada de Cariótipo para a Síndrome do X Frágil, as culturas celulares são incubadas em meios de cultura deficientes em ácido fólico, que induz a fragilidade na região Xq27.3 do cromossomo. Outros processos de incubação e bandeamento G permitem a visualização (Figura 5) e classificação dos cromossomos. Sabe-se que o método pode falhar na detecção da fragilidade em mulheres e homens afetados pela síndrome, que podem não apresentar a fragilidade no cromossomo X. Devido a insuficiência de especificidade e sensibilidade, este método não é recomendado para o diagnóstico da SXF. A principal vantagem do Cariótipo é a possibilidade de



identificação de outras alterações cromossômicas morfológicas ou numéricas, comumente encontradas em indivíduos com retardo mental e outros distúrbios cognitivos (Shtorch *et al.*, 2012).



Figura 5. Imagem de cromossomos X metafásicos mostrando estrutura cromossômica normal e com o sítio frágil na região Xq27.3.

Fonte: QUEIROZ, 2006. Com modificações.

## 2.7 Testes de Iminocitoquímica e Imunohistoquímica

O ensaio de imunocitoquímica, descrito por Willemsen em 1995, informa o percentual de FMRP em linfócitos das amostras de sangue analisadas. Os linfócitos são visualizados em microscópio óptico e determina-se o percentual através do número de linfócitos positivos, os que apresentarem coloração avermelhada. Pacientes afetados possuem de 0 a 15% de FMRP, enquanto pessoas normais apresentam de 80 a 100%. A técnica é eficaz no diagnóstico de pacientes afetados do sexo masculino (WILLEMSSEN *et al.*, 1995).

O teste de imunohistoquímica detecta a presença ou ausência da proteína FMRP. Portanto, pode ser utilizado como um método alternativo no diagnóstico pré-natal em amostras de vilos coriais, quando há indicação clínica de mutação completa em fetos do sexo masculino. O método não é recomendando no diagnóstico pré-natal de fetos do sexo feminino, pois uma mesma amostra de vilos coriais pode se apresentar em um momento como completamente positiva ou negativa. Os autores

atribuem este fenômeno à inativação aleatória do cromossomo X em células de fetos do sexo feminino (Willemsen *et al.*, 2002)

## **2.8 Southern Blotting – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)**

*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 dos sexos 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 a ocorrência de sequências repetitivas de tamanho pequeno, que são importantes para se distinguir as sequências normais das pré-mutadas (ROSALES-REYNOSO *et al.*, 2009).

O teste utiliza uma combinação de enzima de restrição, como a *EcoRI*, para detectar a expansão, com uma sonda específica para o gene *FMR1*. Em geral, a sonda mais usada é a StB12.3 ou equivalente. Para detectar a metilação do gene, as enzimas *EagI* ou *NruI* são usadas. Quando existe DNA metilado há falha no corte da enzima, diferenciando assim, alelos metilados de não metilados. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão enzimática são submetidos à corrida de eletroforese em gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular conhecido. O DNA é transferido para uma membrana de nylon e hibridizado com a sonda marcada com material quimioluminescente (GOLD *et al.*, 2000). A técnica de *Southern blotting* é inconveniente como diagnóstico de rotina, pois apresenta custo alto, é laboriosa, requer grande quantidade de DNA de alta qualidade. Adicionalmente, alguns protocolos, exigem a manipulação de material radioativo (OOSTRA & WILLEMSSEN, 2009).

## **2.9 PCR**

A técnica da PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* = reação em cadeia da polimerase) é um método *in vitro* que permite a partir de uma pequena quantidade de DNA, a amplificação de sequências específicas. Várias condições de PCR, pares de iniciadores e métodos de separação e detecção dos alelos já foram descritos para diagnóstico laboratorial da SXF. Teoricamente, todas as reações de PCR, para

pesquisa de qualquer loco, podem falhar na detecção de um alelo se existir um polimorfismo no local de anelamento do iniciador. Porém, não há qualquer polimorfismo conhecido que afete os iniciadores comumente utilizados no diagnóstico da SXF (HALLAHAN *et al.*, 2012).

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 necessária atenção na realização dos trabalhos para evitar contaminações cruzadas e inviabilizar os resultados (FILIPOVIC-SADIC *et al.*, 2010).

A mistura padrão de PCR contém a amostra de DNA a ser estudada, um par de iniciadores, a enzima termoestável *Taq* DNA Polimerase e quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) em uma solução tampão. Os pares de iniciadores utilizados devem ser complementares às extremidades da sequência de DNA de interesse. A primeira etapa da reação de 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 série de desnaturação, anelamento e extensão, que ocorrem em diferentes temperaturas, é chamada ciclo. 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 (ROSALES-REYNOSO *et al.*, 2009).

Considerando-se o diagnóstico específico para a SXF, após a amplificação dos produtos, estes são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, e revelados por um intercalante de DNA, como o brometo de etídio. Em seguida, os tamanhos dos fragmentos podem ser visualizados e analisados (CARVALHO, 2003).

As mutações completas têm grandes repetições CGG e são muito difíceis de serem amplificadas, pois os fragmentos produzidos pela PCR, conhecidos como amplicons, 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 a presença da mesma, um indivíduo normal (LUO *et al.*, 2009).

As mulheres normais podem apresentar um ou dois pedaços amplificados, dependendo de as repetições CGG em seus dois cromossomos X apresentarem tamanhos aproximados ou não. Assim, nas mulheres com a suspeita de mutação completa, outra técnica de análise é necessária, como a técnica de sequenciamento, 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).

## **2.10 Sequenciamento**

Métodos automáticos para o sequenciamento da região das repetições de CGG também podem ser aplicados para diagnóstico da síndrome. Em uma minoria de indivíduos com SXF, outros mecanismos que não a expansão de CGG, como deleções ou mutações de ponto, são responsáveis pelas manifestações da doença. Nestes casos são indicados estudos específicos, como o sequenciamento do gene FMR1 ou regiões do gene (SHERMAN *et al.*, 2005). Porém, a técnica é mais utilizada em pesquisa, devido ao alto custo de equipamento e material de consumo.

## **2.11 MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)**

A técnica de MLPA foi desenvolvida e descrita por Schouten e colaboradores (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) descreveu 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.

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. Entretanto, o MLPA é de difícil padronização, devido as sondas serem muito sensíveis, exige uma grande quantidade de DNA íntegro, requer alto investimento em equipamentos e kits utilizados. (SHEN e WU, 2009)

## **2.12 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 se elaborar a história familiar identificar os indivíduos que possivelmente herdaram o gene *FMR1* alterado. (HESSL *et al.*, 2005). Uma vez realizado o diagnóstico laboratorial de um paciente e detectada a presença da mutação, é importante o aconselhamento genético familiar e a continuidade da investigação molecular nos demais membros da família.

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, e contribuirá também de forma fundamental com as informações sobre a transmissão da SXF. O conselheiro genético pode a partir de uma ampla investigação de todos os fatos genéticos envolvidos, auxiliar decisivamente um casal a planejar seu futuro, de forma a prevenir a recorrência da síndrome na família (BARDONI *et al.*, 2006).

O conselheiro geneticista redirecionará terapias avançadas, indicando as mais específicas e compatíveis com as peculiaridades da doença. Consequentemente, contribuirá de forma eficiente para o tratamento, nas estratégias de intervenção e para as tomadas de decisão da família. As intervenções de especialistas capacitados para trabalharem com a síndrome contribuirão significativamente para minimizar os problemas ocasionados e para auxiliar as pessoas com SXF a desenvolverem o máximo de suas potencialidades e melhorarem sua qualidade de vida (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 medicamentoso, 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).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Este estudo faz parte do Projeto Rede ExeGenS, 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 1). Os pacientes ou seus responsáveis legais foram informados a respeito da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Foram selecionados 35 pacientes, sendo 3 do sexo feminino e 32 do sexo masculino, todos procuraram o LaGene para diagnóstico genético com indicação clínica para a SXF no período de setembro de 2011 à Dezembro de 2012.

#### **3.2 Extração e quantificação do DNA genômico**

As amostras biológicas de todos os pacientes foram obtidas a partir da coleta de 5,0 mL de sangue periférico, em tubos com o anticoagulante 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 foi estimada para cada amostra com o auxílio do espectrofotômetro *NanoVue® Plus* (GE Healthcare Life Sciences, EUA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

#### **3.3 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase**

A técnica de PCR para a pesquisa da SXF foi descrita por Fu e colaboradores (1991). Ela tem sido amplamente usada em laboratórios de genética molecular humana para a triagem inicial no diagnóstico da síndrome. No presente estudo, foram realizadas duas técnicas de PCR convencional, doravante

denominadas de PCR de triagem (PCR-T) e PCR para pré-mutação (PCR-P). Ambas foram utilizadas com adaptações, sendo a principal delas a substituição de um dos iniciadores sugeridos pelo autor, o iniciador 2, pelo iniciador F, (Figura 6) (GOMEZ, 2011).

### Iniciador C e Iniciador 2

```

5'
13621 GAGCCCGCGG GGGGAGGGAA CAGCGTTGAT CACGTGACGT GGTTTCAGTG TTTACACCCG
13681 CAGCGGGCCG GGGGTTCGGC CTCAGTCAGG CGCTCAGCTC CGTTTCGGTT TCACTTCCGG
13741 TGGAGGGCCG CCTCTGAGCG GGC GGCGGGC CGACGGCGAG CGCGGGCGGC GGC GGTGACG
13801 GAGGCGCCGC TGCCAGGGGG CGTGCGGCAG CGCGGGCGGC GCGGGCGGCG CGGCGGCGGC
13861 GGAGGCGGCG GCGGCGGCGG CGGCGGCGGC GGCTGGGCCT CGAGCGCCG CAGCCACCT
13921 CTCGGGGGCG GGCTCCCGGC GCTAGC AGGG CTGAAGAGAA GATGGAGGAG CTGGTGGTGG
13981 AAGTGC GGCGG CTCCAATGGC GCTTTCTACA AGGTACTTGG CTCTAGGGCA GGCCCCATCT
14041 TCGCCCTTCC TTCCCTCCCT TTTCTTCTTG GTGTCGGCGG GAGGCAGGCC CGGGGCCCTC
3'

```

### Iniciador C e Iniciador F

```

5'
13621 GAGCCCGCGG GGGGAGGGAA CAGCGTTGAT CACGTGACGT GGTTTCAGTG TTTACACCCG
13681 CAGCGGGCCG GGGGTTCGGC CTCAGTCAGG CGCTCAGCTC CGTTTCGGTT TCACTTCCGG
13741 TGGAGGGCCG CCTCTGAGCG GGC GGCGGGC CGACGGCGAG CGCGGGCGGC GGC GGTGACG
13801 GAGGCGCCGC TGCCAGGGGG CGTGCGGCAG CGCGGGCGGC GCGGGCGGCG CGGCGGCGGC
13861 GGAGGCGGCG GCGGCGGCGG CGGCGGCGGC GGCTGGGCCT CGAGCGCCG CAGCCACCT
13921 CTCGGGGGCG GGCTCCCGGC GCTAGCAGGG CTGAAGAGAA GA TGGAGGAG CTGGTGGTGG
13981 AAGTGC GGCGG CTCCAATGGC GCTTTCTACA AGGTACTTGG CTCTAGGGCA GGCCCCATCT
14041 TCGCCCTTCC TTCCCTCCCT TTTCTTCTTG GTGTCGGCGG GAGGCAGGCC CGGGGCCCTC
3'

```

Figura 6. Local de anelamento dos iniciadores C, 2, e F no gene FMR1 estão sublinhado, e as repetições CGG estão grifados.

As reações de amplificação foram realizadas com os controles: negativo e o branco. Como controle negativo foi usado uma amostra de DNA de um indivíduo não afetado pela síndrome do X frágil, cujo gene *FMR1* possui um tamanho de alelo amplificável, para garantir a confiança no sucesso das reações. O controle branco foi caracterizado pela ausência de DNA no sistema de PCR para garantir a ausência de amplificações e, conseqüentemente, prevenir a amplificação cruzada devido á contaminação dos sistemas em teste.



### 3.3.1 Amplificação da Sequencia alvo por PCR-T

A amplificação da sequência de interesse do gene *FMR1* ocorreu em um volume final de 30µL contendo 50ng de DNA, 0,5µM do iniciador C, 0,5µM do iniciador 2 (Tabela 2), 10 µL de 5x Q-Solution (Quiagen, EUA), 200 µM de dNTPs, 2,5 µL de 10x PCR buffer, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, e 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A amplificação constituiu-se de 35 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. O tamanho final esperado do produto de PCR é de aproximadamente 200pb para homens normais e de aproximadamente 200 e 225 para mulheres normais. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores encontra-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. A sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos alelos do gene *FMR1* pelas técnicas de PCR-T e PCR-P para diagnóstico de pessoas com indicação clínica para a SXF em Goiânia – GO.

<i>Técnica</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Sequencia 5'→3'</i>	<i>Tamanho esperado do Produto Amplificado</i>
PCR-T	C	GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT	198 + 3n
	2	TCCTCCATCTTCTTTCAGCCCT	
PCR-P	C	GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT	221 + 3n
	F	AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA	

n = número de repetições de trinucleotídeos (CGG)

### 3.3.2 Amplificação da sequencia alvo por PCR-P

A técnica foi neste trabalho denominada de PCR para Pré-mutação (PCR-P) devido a estratégia de amplificação de fragmentos de até ~330 repetições CGG que contém mutação completa de baixa expansão em pacientes do sexo masculino e fragmentos de até ~160 CGG contendo a pré-mutação em indivíduos do sexo feminino.

A segunda reação foi realizada com volume final de 25µL contendo 50ng de DNA, 0,5µM do iniciador C, 0,5µM do iniciador F, 10 µL de 5x Q-Solution (Quiagen, EUA), 200 µM de DNTPs, 2,5 µL de 10x PCR buffer, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA). A amplificação constituiu-se de 35 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para padronizar o protocolo e atingir o objetivo de amplificar as grandes sequencias contendo as pré-mutações foram feitas modificações no protocolo original de Khaniani (2008). As modificações introduzidas no método foram, a mudança temperatura de anelamento de 70° para 60°, do tempo de anelamento de 45 segundos para 1 minuto e do volume de Q-solution de 8 para 10 µL. O tamanho final esperado do produto de PCR foi de aproximadamente 300pb para homens não-afetados e de aproximadamente 300 e 325 para mulheres não-afetadas pela SXF.

### 3.3.3 Eletroforese em gel de Poliacrilamida

Os produtos de ambas PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida à 8%. Foram aplicados 15µL do produto da PCR, juntamente com 5µL de corante *fast green*<sup>®</sup> (Invitrogen, EUA). A eletroforese ocorreu a 100 V por aproximadamente 3 horas, em tampão TBE 1X (Tris Borato EDTA). Ao gel também foi acrescido um marcador de peso molecular de 100pb para posterior estimativa do tamanho do fragmento amplificado.

Após o procedimento de eletroforese, o gel de poliacrilamida foi corado em TBE 1X contendo 5µL/ml de Brometo de etídio. A visualização dos amplicons foi feito com o auxílio de um transluminador ultravioleta. Após se estimar o tamanho do fragmento em pares de bases foi possível calcular o valor aproximado do número de repetições de CGG presente em cada amostra analisada, o tamanho da repetição CGG correspondeu à subtração do tamanho do produto da amplificação da soma do número de bases de cada iniciador e o número de bases que flanqueiam a região de repetições de CGG do gene FMR1.

O diagnóstico foi definido pelo número de repetições de CGG, que enquadra o paciente em uma das categorias de classificação da SXF: não-afetados, zona gray, pré-mutado ou afetado (Tabela 3). Há a possibilidade de o diagnóstico ser inconclusivo quando mulheres apresentarem somente um fragmento amplificado ou homens não apresentarem qualquer fragmento amplificado, sendo neste caso além de inconclusivo, sugestivo da presença da mutação completa, ou seja, de que o paciente é afetado pela síndrome.

Tabela 3. Representação do tamanho dos fragmentos esperados após as técnicas de PCR-T e PCR-P.

Classificação	Amplicons gerados pela PCR-P		Amplicons gerados pela PCR-T	
	♂	♀	♂	♀
Não-afetados	≈ 300pb*	300 e 325pb	≈ 200pb	200 e 225pb
Zona gray	400pb	300 e 400pb	300pb	200 e 300pb
Inconclusivos	_____	300pb	_____	200pb
Pré-mutação	600pb	300 e 600pb	_____	_____

\*pb: pares de base.

O tamanho dos fragmentos obtidos foi determinado utilizando como referência o marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Com o tamanho do fragmento em pares de bases é possível calcular o valor aproximado do número de repetições de CGG presente em cada amostra analisada. Para tanto se subtrai o valor esperado do produto da amplificação sem a repetição do trinucleotídeo CGG (198 pares de bases), que se refere à soma do número de bases de cada iniciador (Iniciador C e Iniciador 2) e o número de bases que flanqueiam a região de repetições de CGG do gene FMR1, o mesmo é feito para os iniciadores C e F (221 pares de bases).

O diagnóstico é definido pelo número de repetições de CGG, que enquadra o paciente em uma das categorias de classificação da SXF: normal, zona gray, pré-

mutado ou afetado. Há a possibilidade de o diagnóstico ser inconclusivo quando mulheres apresentarem somente um fragmento amplificado ou homens não apresentarem qualquer fragmento amplificado, sendo neste caso além de inconclusivo, sugestivo da presença da mutação completa, ou seja, de que o paciente é afetado pela síndrome.

### **3.4 Análise estatística**

Os dados obtidos no presente estudo foram submetidos a testes estatísticos não-paramétricos. O teste utilizado foi o de Fischer para análise de significância de diferenças entre dois grupos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo foram categorizados conforme a conclusividade e inconclusividade dos resultados. Os conclusivos foram classificados em grupos, de acordo com o número de repetições de CGG, e de acordo com a indicação clínica para a Síndrome do X Frágil, considerando-se em ambos os casos o sexo dos pacientes avaliados.

O número de repetições de CGG dos pacientes definidos pelas técnicas de PCR-T e PCR-P foram comparados quanto à concordância dos resultados e quanto à frequência observada na população estudada.

Para triagem molecular da SXF, foram encaminhados 35 pacientes ao Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-GO juntamente com o Laboratório de Citogenética e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás, na cidade de Goiânia. O grupo amostral conteve 32 pacientes do sexo masculino e 3 do sexo feminino (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição percentual da frequência e amostras de propósitos com indicação clínica de SXF quanto ao sexo.

Sexo	Frequência	
	Absoluta	Relativa
Masculino	32	91%
Feminino	03	9%
Total	35	100%

Os resultados obtidos a partir das análises das amostras de sangue de 35 pacientes com indicação clínica para a Síndrome do X Frágil, pelas duas técnicas de PCR, PCR de Triagem (PCR-T) e PCR para Pré-mutação (PCR-P), foram classificados em dois grupos: conclusivos e inconclusivos. O diagnóstico foi definido como conclusivo quando os produtos resultantes da amplificação da região específica do gene FMR1 mostraram um alelo em pacientes do sexo masculino, ou dois alelos em pacientes do sexo feminino. Resultados que não apresentaram

nenhuma amplificação ou amplificação de apenas um alelo em pacientes do sexo feminino foram classificados como inconclusivos.

Um resultado conclusivo em pacientes do sexo feminino só é possível quando dois alelos distintos forem amplificados pela PCR. Isto é decorrente da presença de dois cromossomos X no genoma feminino. Homens, por serem hemizigóticos para o X em seu genoma, amplificam apenas um alelo do gene FMR1. Neste caso, a ausência da amplificação, além de resultar em diagnóstico inconclusivo, é sugestivo de paciente afetado pela SXF.

Os resultados mostram uma melhora significativa na conclusividade do diagnóstico quando realizadas as análises pela técnica de PCR-P. De todos os casos estudados, 88% e 100% foram conclusivos quando analisados pela técnica de PCR-T e PCR-P, respectivamente. A figura 7 mostra a diferença entre as amostras ao se realizar os ensaios de PCR-T e PCR-P.

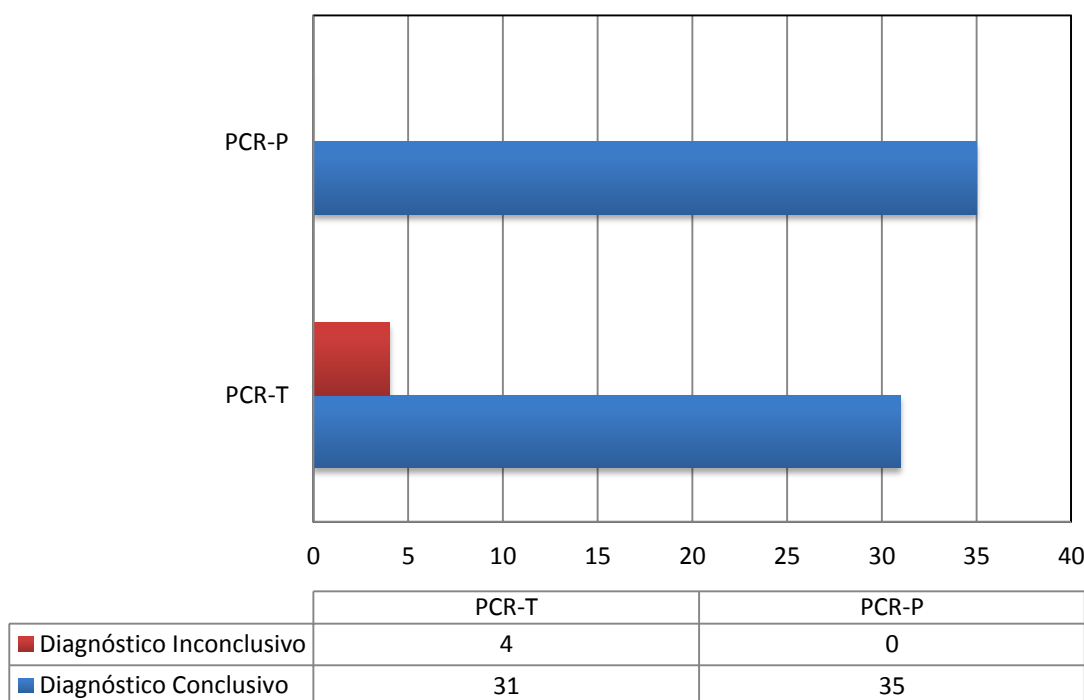


Figura 7. Influência da técnica de PCR para pré-mutação (PCR-P) em comparação com a PCR de triagem (PCR-T) no diagnóstico de pacientes com indicação clínica para síndrome do X frágil. O número de diagnósticos conclusivos e inconclusivos, para todos os pacientes analisados, é mostrado através de barras horizontais.

Esses resultados são considerados muito satisfatórios para técnicas de PCR no diagnóstico da SXF. QUEIROZ (2006) obteve um resultado semelhante ao desse estudo, indicando que a estratégia de incluir a PCR-P na análise, a eficiência do diagnóstico da síndrome do x frágil aumenta.

Nos resultados da PCR-T, os 4 pacientes classificados como inconclusivos, 2 eram do sexo feminino e 2 do sexo masculino. E para a PCR-P nenhum foi paciente classificado como inconclusivo.

O aumento da taxa de diagnósticos conclusivos pela técnica de PCR-P em pacientes do sexo feminino ocorreu devido á eficácia na amplificação de alelos correspondentes á zona gray e pré-mutação e ao aprimoramento de amplificação de dois alelos na faixa normal.

A análise das 35 amostras pela técnica de PCR-T resultou em 88% de conclusivos e a PCR-P resultou em 100% de diagnósticos conclusivos. A técnica de PCR-P mostrou ampla melhoria e maior eficiência na amplificação dos alelos analisados nos pacientes. Mesmo com o baixo número de amostras do sexo feminino (no total 3), o resultado foi significativo quanto a conclusividade do teste para este grupo. As análises estatísticas aplicadas ao estudo de todos os resultados obtidos, provenientes das técnicas de PCR-T e PCR-P não apresentaram valor significativo quando submetidos ao teste de Fisher,  $p= 0,11$ . Esse teste é utilizado para análises de significância de mudanças em amostras relacionadas.

Esses resultados já eram esperados, devido o tamanho do grupo amostral e a pequena variação quanto á conclusividade dos pacientes entre uma técnica e outra. Apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, eles apontam um grande impacto para a família do paciente em questão.

Os resultados conclusivos provenientes das duas técnicas utilizadas foram classificados em não afetado, zona-gray ou pré-mutado, conforme o número de repetições de CGG. O número de pacientes com diagnósticos conclusivos resultantes das análises das técnicas de PCR-T e PCR-P e sua distribuição nos três grupos classificatórios são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Número de pacientes com diagnóstico conclusivo e sua distribuição nos grupos classificatórios (não-afetado, zona-gray, e pré-mutado). Dados comparativos as técnicas de PCR-T e PCR-P.

Classificação/técnicas	PCR-T		PCR-P	
	♂	♀	♂	♀
Não-afetado	30	1	30	2
Zona-gray	-	-	1	1
Pré-mutado	-	-	1	-
Inconclusivo	2	2	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>		<b>35</b>	

É evidente a vantagem do uso da técnica PCR-P em relação à técnica de triagem para a detecção de zona gray e pré-mutados, enquanto se observa que apenas poucos casos de diagnóstico conclusivo foram reportados pela técnica de triagem (em verdade nenhum caso para o grupo de pré-mutados nas amostras femininas). Observa-se que a técnica de PCR-P registra casos de diagnóstico positivo para pré-mutação, não detectados quando analisados pela técnica de PCR-T. É importante lembrar que, enquanto os resultados da PCR de Triagem (PCR-T) não detectam pacientes com pré-mutação (o que é uma limitação intrínseca da técnica), as análises PCR-P detectam até 330 repetições CGG para homens e 160 para mulheres (Saluto *et al.*, 2005).

O sexo dos pacientes enquadrados nos grupos não influenciou a distribuição do resultado de diagnósticos conclusivos em ambas as técnicas.

Embora os números possam parecer não muito significativos, as detecções dos casos de zona gray e pré-mutação são importantes no diagnóstico definitivo de cada paciente. Destaca-se, a importância principalmente nos casos de pré-mutação, pois estes podem transmitir a mutação completa para futuras gerações. No caso de pacientes diagnosticados como zona gray pela técnica de PCR-P, a definição do diagnóstico é igualmente importante, pois dela depende o tratamento aplicado a cada caso.



A comparação dos resultados, em número de repetições de CGG, dos alelos dos pacientes estudados pelas técnicas de PCR-T e PCR-P foram variáveis em alguns casos. Das 35 amostras analisadas, 19 (54%) apresentaram alguma variação no número de repetições de CGG. Estas variações, ocorreram em pequena escala e, nestes casos, a diferença foi de apenas uma ou duas repetições de CGG, com mediana (das variações) de 2 CGG. A maior diferença encontrada foi a de 10 repetições de CGG, mas, novamente, sem alteração na classificação e diagnóstico do paciente.

Em apenas três casos ocorreu alteração da classificação do paciente, um de normal para zona gray, e os outros dois de inconclusivo para normal, e pré-mutação. Porém, nestes casos, os alelos variaram de 37 repetições de CGG para 40 repetições de CGG, resultados provenientes das técnicas de PCR-T e PCR-P, respectivamente. Esses resultados observados foram semelhantes ao de Filipovic-Sadic e colaboradores (2010), quando esse tipo de alteração ocorreu em apenas duas amostras.

Dos casos estudados, os resultados referentes à variação no número de repetições de CGG de um mesmo alelo analisado pelas duas técnicas, PCR-T e PCR-P, se mostrou estável e confiável.

#### **4.1 Variação no número de repetições de CGG das amostras analisadas em duplicata pela técnica de PCR-T e PCR-P**

A ocorrência de pequenas variações no número de repetições de CGG em exames realizados em duplicata pode ser observada. A reprodução técnica dificilmente é desenvolvida de forma idêntica. Diferenças na alíquota de produtos para confecção de géis para corrida eletroforética podem resultar em variação da porosidade e, conseqüentemente, na velocidade de corrida do produto da PCR; a definição do tamanho do fragmento analisado em pares de bases também é um ponto crítico, por ser uma análise visual, pequenas variações podem ocorrer de uma leitura para outra.

Todas as 35 amostras foram analisadas em duplicata, essas duplicatas revelaram variação do número de repetições de CGG. Pela técnica de PCR-T, na

análise de um mesmo paciente, o resultado variou em até 5 repetições de CGG e pela PCR-P, em até 3 repetições de CGG. Outra vez, em nenhum dos casos houve modificação da classificação e diagnóstico dos pacientes.

#### 4.2 Interpretação e visualização dos produtos da amplificação da PCR-T e PCR-P em gel de poliacrilamida

A visualização e definição do tamanho do fragmento amplificado pelas técnicas de PCR permitem o cálculo do número de repetições CGG presentes em cada amostra analisada. Cada resultado, em número de repetições de CGG, foi enquadrado em uma das classificações da SXF.

Os geis de poliacrilamida, corado com brometo de etídio, permitiu a visualização dos alelos amplificados pelas reações de PCR. (Figura 8 e 9).

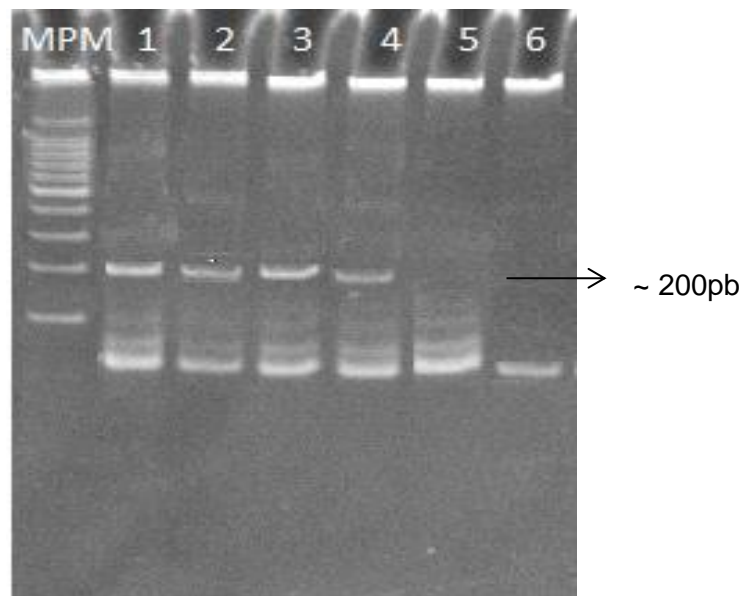


Figura 8. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-T em gel de poliacrilamida. Alelos inconclusivos de pacientes do sexo feminino estão localizados nas fileiras 1, e 2. Alelos normais de pacientes do sexo masculino encontram-se na fileira 3 e 4, resultado inconclusivo de paciente do sexo masculino na fileira 5, e controle branco na fileira 6. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases.

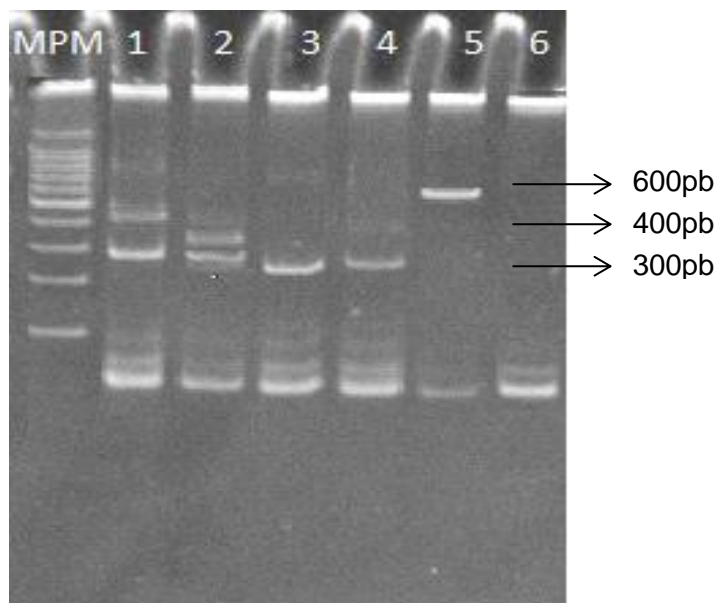


Figura 9. Visualização dos fragmentos amplificados pela PCR-P em gel de poliacrilamida das mesmas amostras. Alelo zona gray e normal de pacientes do sexo feminino estão localizados nas fileiras 1 e 2. Alelos normais de pacientes do sexo masculino estão nas fileiras 3 e 4, pré-mutado na fileira 5 também do sexo masculino, e controle branco na fileira 6. “MPM” se refere a marcador de peso molecular e “pb” a pares de bases.

Através da PCR-P foi possível visualizar uma banda com pré-mutação, isso devido a eletroforese em poliacrilamida. Géis feitos de polímeros de acrilamida são amplamente utilizados para esse tipo de diagnóstico e a resolução das bandas de DNA é geralmente melhor comparada com o gel de agarose (GODDE *et al.*, 2006).

A amplificação de sequências de DNA que contenham repetições de trinucleotídeos é problemática devido à formação de estruturas secundárias. Regiões ou sítios reconhecidos como locais de pausa da DNA polimerase podem estar próximos a *hairpins*, estruturas secundárias normalmente formadas em regiões ricas em CG. O reagente *Q-solution* (Quiagen), utilizado no protocolo da PCR-P, elimina as pausas causadas pelos *hairpins* e permite a completa amplificação da sequência de repetições CGG (FRITSCH, 2011).

Os maiores alelos amplificados, nas amostras analisadas neste trabalho, por PCR-T foram de 43 repetições de CGG, em paciente do sexo feminino, e de 47

repetições de CGG em paciente do sexo masculino. A PCR-T permitiu, a visualização de alelos normais e zona gray.

A técnica de PCR-P foi eficiente na amplificação de alelos com grande número de repetições de CGG, sendo os maiores alelos detectados de 56 repetições de CGG, em paciente do sexo feminino, e de 76 repetições de CGG em paciente do sexo masculino.

O protocolo da PCR-P permite a visualização direta dos produtos da PCR em gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio, também foi mais eficiente na visualização de conclusividade de alelos menores, normais, nos pacientes do sexo feminino, não deixando dúvidas de suas vantagens comparadas à PCR-T.

#### **4.3 Proposta de estratégia para diagnóstico laboratorial da SXF**

O objetivo geral desse estudo foi de propor e validar uma técnica de diagnóstico para a síndrome do X frágil, podendo assim ampliar os exames genéticos oferecidos pelo LaGene (SES/GO) à população do Estado de Goiás.

O diagnóstico laboratorial e clínico da SXF segue recomendações e protocolos internacionais. Para o diagnóstico laboratorial são indicados os exames pela técnica de PCR para triagem inicial e sua combinação com outras técnicas moleculares quando necessária.

Uma estratégia de diagnóstico é proposta a seguir, incluindo a PCR para pré-mutação, como técnica preferencial na triagem de homens e mulheres com suspeita clínica e/ou histórico familiar da SXF (Figura 10 e 11).

Para pesquisa da expansão de repetições de CGG, no gene *FMR1* em mulheres, com suspeita clínica e/ou histórico familiar para a síndrome, sugere-se a triagem do diagnóstico pela técnica de PCR-P. Caso os resultados permanecerem inconclusivos, sugere-se prosseguir com a investigação familiar, já que a doença é hereditária, ligada ao cromossomo X, e em geral os indivíduos afetados tem um ascendente portador da pré-mutação.

O teste de PCR-P nos pais de pacientes do sexo feminino pode descartar ou enfatizar a suspeita da SXF. Caso os pais sejam normais para a mutação no gene FMR1, a paciente, portanto não é afetada para a síndrome.

Resultados dos genes maternos e paternos inconclusivos ou a presença de pré-mutação requerem um estudo com uma técnica mais específica, nesse caso o sequenciamento, para a confirmação do diagnóstico. O resultado da análise dos pais auxilia na conclusão final do diagnóstico da paciente em análise e pode evitar a utilização de outras técnicas que deixariam o exame de alto custo e de longo tempo de análise.

Para o diagnóstico laboratorial de homens com indicação clínica para a SXF, sugere-se que dois grupos sejam considerados: pacientes com suspeita clínica e pacientes com histórico familiar para a SXF. Vale lembrar que nesse estudo foram analisados apenas pacientes com indicação clínica. No estudo de pacientes com suspeita clínica a técnica de PCR-T mostrou-se confiável e pode ser utilizada, como já realizado em rotinas laboratoriais, para estudo de pacientes com histórico familiar, a pesquisa deve ser feita pela PCR-P, pois estes pacientes apresentam maior propensão à presença de pré-mutação, não evidenciada pela PCR-T. Além disso, casos de mosaïcismo correm o risco de serem considerados normais pela técnica de PCR-T.

Todos os pacientes, tanto homens quanto mulheres, pertencentes a famílias já diagnosticadas como portadoras da SXF com padrão de mosaïcismo, devem sempre realizar o estudo pela técnica de sequenciamento. Essa técnica dará uma resposta com maior confiabilidade, auxiliando para um apropriado aconselhamento genético e tratamento da doença.

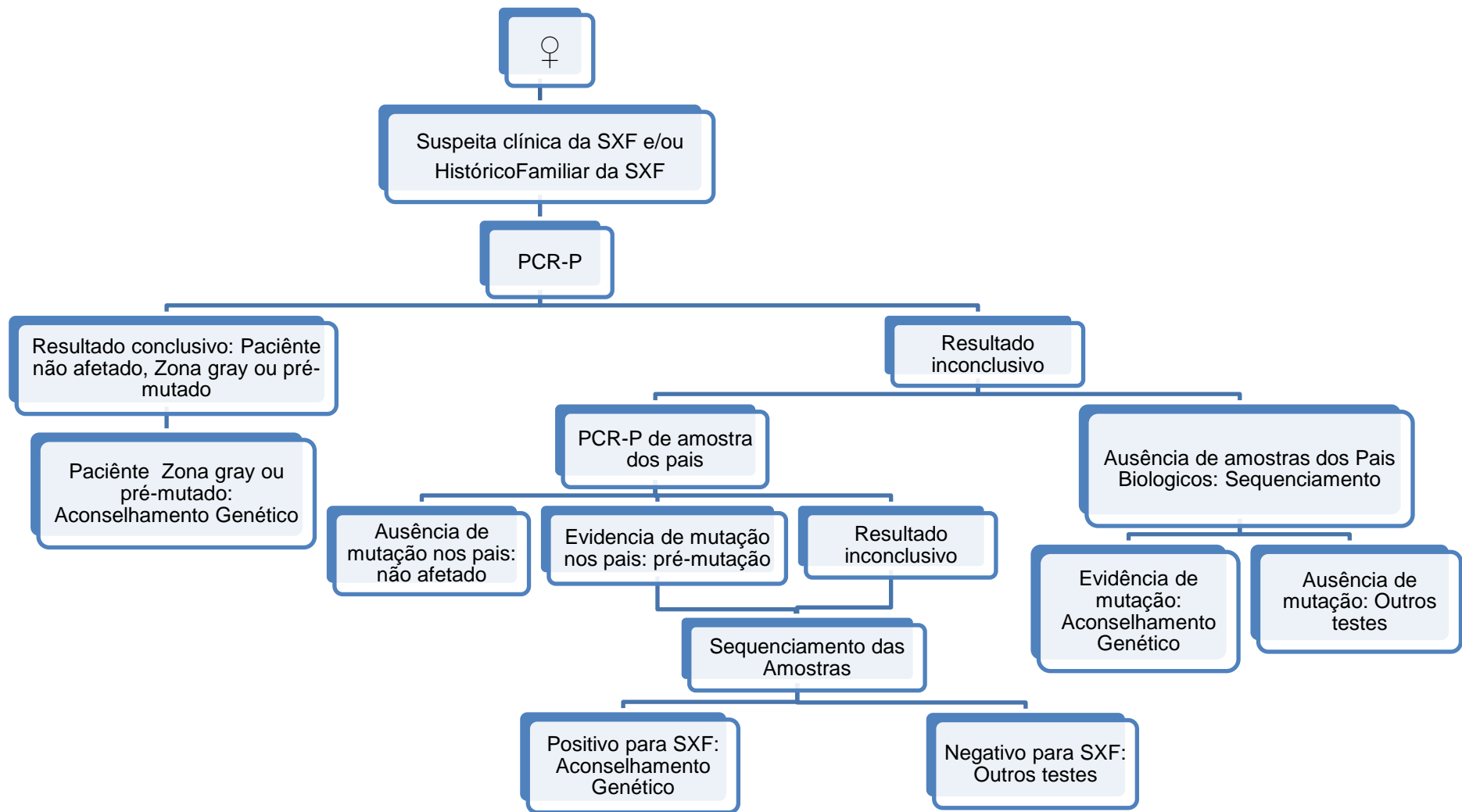


Figura 10. Fluxograma proposto para protocolo de diagnóstico laboratorial da SXT em mulheres com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome.

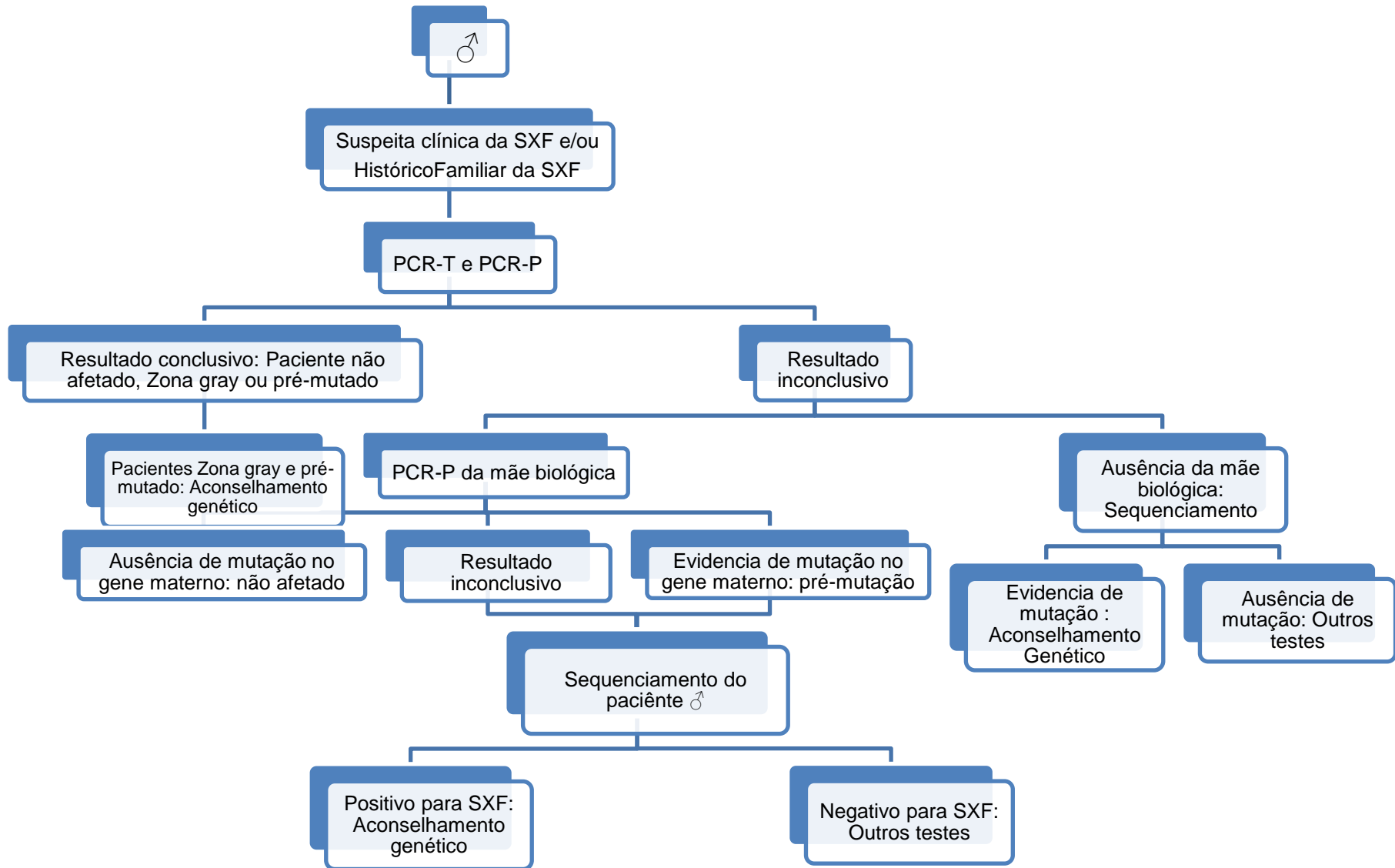


Figura 11. Fluxograma proposto para diagnóstico laboratorial da SXF em homens com suspeita clínica ou histórico familiar para a síndrome.

A rapidez e economia das técnicas de PCR justificam o seu uso em triagem no diagnóstico da SXF, mesmo quando incluídos os estudos de investigação familiar, e realização da PCR-P para gene materno e/ou paterno. A estratégia de diagnóstico sugerida parte do princípio de que todos os indivíduos afetados pela SXF têm um ascendente com pré-mutação do gene FMR1. Portanto, pode-se descartar ou enfatizar a suspeita da SXF se realizado o teste PCR-P nos pais de cada paciente com diagnóstico inconclusivo. Assim, um estudo mais específico será realizado somente em casos concretos de suspeita da síndrome e em pacientes com familiares portadores da SXF com padrão de mosaicismo.

A abordagem apresentada, leva em questão as limitações e difícil acesso de famílias a serviços da genética no Brasil. Os testes de PCR-T e PCR-P são de baixo custo, quando comparado a outras técnicas, e os equipamentos necessários de fácil acesso, comparativamente a técnica de sequenciamento.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico de DM na rotina de um laboratório de genética é trabalhoso e exige tanto uma triagem eficiente no atendimento clínico quanto o uso de testes moleculares que certifiquem ou descartem uma origem genética da DM.

Mais de uma década após a expansão da repetição de CGG no gene FMR1 ser identificada como causa predominante do desenvolvimento da Síndrome do X Frágil (SXF), várias técnicas de diagnóstico foram desenvolvidas. O diagnóstico por técnicas moleculares é o mais utilizado atualmente, principalmente a combinação de algumas delas com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Embora o uso de técnicas moleculares tenha promovido um grande avanço no diagnóstico da SXF, ainda existem barreiras de ordem econômica e técnica que dificultam seu uso na rotina.

A associação de dois métodos de PCR torna possível implementar uma estratégia eficiente de triagem molecular para a SXF. A metodologia utilizada mostrou-se capaz de identificar portadores da pré-mutação no gene FMR1, embora apresente baixa sensibilidade na detecção de alelos mutados em indivíduos do sexo feminino, mais isso pode ser complementado com outras técnicas em casos específicos.

De qualquer modo esta metodologia diminui significativamente o uso de metodologias de alto custo e difícil padronização. Uma vez excluindo o diagnóstico da SXF, outras abordagens poderão ser utilizadas para se investigarem causas menos frequentes de DM, principalmente outras formas ligadas ao cromossomo X.

Este trabalho teve por objetivo principal padronizar, através de do método comparativo de duas técnicas de PCR, o diagnóstico da Síndrome do X Frágil. As técnicas selecionadas no estudo foram a PCR de Triagem (PCR-T), descrita por Fu e colaboradores em 1991, e a PCR para Pré-mutação (PCR-P) – como designada neste trabalho – desenvolvida por Saluto e colaboradores em 2005. A principal diferença no protocolo da PCR-P é o segundo primer utilizado, o qual é mais específico e facilita a detecção da expansão de repetição de CGG e dispensa procedimentos caros e demorados como a hibridização com sondas radioativas ou quimioluminescentes na visualização de alelos de grandes expansões de CGG, particularmente na faixa de pré-mutação.

## 6 REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

CID-10. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. **Porto Alegre: Artes Médicas**. 1993.

COFEE, 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.

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; ALBUD, E.,M; LIPAY, M.,V; COSTA, S.,S; VIANNA-MORGANTE, A., M; BELLUCO, F.,T; NOGUEIRA, S.,I; KULOKOWSKI, L.,D;

BRUNONI, D; JULIANO, Y; RAMOS, M., A; MELARAGNO, M, I; Evaluation of clinical checklist for fragile x syndrome screening in Brazilian intellectually disable males: proposal for a new screening tool. **J Intelled Disabil**. 2009. Sep; 13(3):239-48.

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.

DSM-IV. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Referência rápida aos critérios diagnósticos Porto Alegre: **Artmed**. (4a. ed.) 2003.

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.

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.

FU, Y. H., D. P. KUHL, A. PIZZUTI, M. PIERETTI, J. S. SUTCLIFFE RICHARDS, A. J. VERKERK, J. J. HOLDEN, R. G. FENWICK, JR., S. T. WARREN e colaboradores. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, 67, 1047-58. 1991.

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.

FRITSCH, P., M. **Triagem molecular para a síndrome do X-frágil em pacientes com deficiência mental atendidos no HUB/Unb. Brasília.** [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Brasília. 2011.

GALVAN., A., M. & GALVEZ., R. Neocortical vasculature in the Fragile X mental retardation syndrome. **Brain Research**; 1471: 155-161. 2012.

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

GODDE, R., D., A; AKKAD, L; ARNING, G; DEKOMIEN, J; HERCHENBACH, E; KUNSTMANN, M; MEINS, S; WIECSOREK, J., T. EPPLEN E S. HOFFJAN. Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics, alternatives and future prospects. **Electrophoresis-journal** (27):5;6. 939-46. 2006.

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.

GOLD B., D. RADU, A. BALANKO E C. S. CHIANG. Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol. **Mol Diagn**, v.5, n.3, Sep, p.169-78. 2000.

GOMEZ, M., K., A. **Estudos dos alelos da região 5'UTR no gene FMR1 (Fragile X Mental Retardation) em homens da população geral de Salvador-BA. Bahia.** [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal da Bahia. 2011.

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.

HALLAHAN, P., B; DALY, M., E; SIMMONS, A; MOORE, C., J; MURPHY, K., C; AND MURPHY, D., D., C. Fragile X syndrome: a pilot proton magnetic resonance spectroscopy study in premutation carriers. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**. 4:23. 2012.

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.

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.

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.

HUNDSCHIED, R. D., SISTEMANS, E.A., THOMAS, C.M., BRAAT, D. D., STRAATMAN, H., KIEMENEY, L.A., OOSTRA, B.A., SMITS, A.P. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. **Am J Hum Genet**. 66(2):413-8. 2000.

IBGE, 2012. Microdados do IBGE. Site: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados\\_preliminares amostra/default resultados preliminares amostra.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_preliminares amostra/default resultados preliminares amostra.shtm)

JACQUEMONT, S., HAGERMAN, R. J., LEEHEY, M. A., HALL, D. A., LEVINE, R. A., BRUNBERG, J. A., ZHANG, L., JARDINI, T., GANE, L. W., HARRIS, S. W., HERMAN, K., GRIGSBY J., GRECO, C. M., BERRY-KRAVIS E., TASSONE F., HAGERMAN, P. J. Penetrance of the fragile x-associated tremo/ataxia syndrome in a permutation carrier population. **JAMA**. 28;291(4):460-9. 2004.

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

KHANIANI, M.,S; KALITSIS, P; BURGESS, T AND SLATER, H.,R. An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG

Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (FMR1). **Molecular Cytogenetics**. 1:5, 2008.

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.

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.

LEHRKE, ROBERT. A theory of X-linkage of major intellectual traits. **American Journal of Mental Deficiency**. Vol 76(6): 611-619; 1972.

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. **Journal of Molecular Diagnostics**. vol. 10, n. 5, set. 2008.

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.

LUBS, H. A. A marker X chromosome. **Am J Hum Genet**. v.21, n.3, May, p.231-44. 1969.

MANDEL JL, BIANCALANA V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. **Growth Horm IGF Res**. 2004.

MARTIN JP, BELL J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. **J Neurol Psychiatry**. 6:151-54; 1943.

MCCARY, L., M. & ROBERTS, J., E. Early identifications of autism in fragile x syndrome: a review. **Journal of intellectual disability research**. 10: 1365-2788. 2012.

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.

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, 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.

QUEIROZ, M., A. **Avaliação de pré-mutação por PCR na síndrome do X-frágil**. Florianópolis, 2006. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina.

REIS, A.H.O. **Frequência 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.

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

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.

SALUTO, A., BRUSSINO, F., TASSONE, C., ARDUINO, C., CAGNOLI, P., PAPPI, P., HAGERMAN, N., MIGONE E A. BRUSCO. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. **J Mol Diagn**, v.7, n.5, Nov, p.605-12. 2005.

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.

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

SULLIVAN, A. K., D. C. CRAWFORD, E. H. SCOTT, M. L. LESLIE E S. L. SHERMAN. Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. **Am J Hum Genet**. v.70, n.6, Jun, p.1532-44. 2002.

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., B. A. PLETCHER E D. A. DRISCOLL. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. **Genet Med**, v.7, n.8, Oct, p.584-7. 2005.

SHTORCH, A.; AMIEL, A.; PELES, L.; PRAS, E.; RIES-LEVAVI, L. Three peaks in the polymerase chain reaction fragile X analysis. **Journal of Medical Screening**. (19):3112-115. 2012.

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. **Arg Neuropsiquiatr**, v.63(3A), p.564-70, 2005.

STEGANI, F., C. **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. [Dissertação de Mestrado]. Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

STÖGER R., GENEREUX D.P., HAGERMAN R.J., HAGERMAN P.J., TASSONE F., *et al.* Testing the *FMR1* Promoter for Mosaicism in DNA Methylation among CpG Sites, Strands, and Cells in *FMR1*-Expressing Males with Fragile X Syndrome. **PLOS ONE**. 6(8):23648. 2011.

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.

UEHARA, D.T. **Pesquisa de microarranjos em genes candidatos a surdez síndrômica e não-síndrômica**. 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.

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

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.

WILLEMSSEN, R., C. J. BONTEKOE, L. A. SEVERIJNEN E B. A. OOSTRA. Timing of the absence of *FMR1* expression in full mutation chorionic villi. **Hum Genet**, v.110, n.6, Jun, p.601- 5. 2002.

WILLEMSSEN, R., S. MOHKAMSING, B. DE VRIES, D. DEVYS, A. VAN DEN OUWELAND, J. L. MANDEL, H. GALJAARD E B. OOSTRA. Rapid antibody test for fragile X syndrome. **Lancet**, v.345, n.8958, May 6, p.1147-8. 1995.

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



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

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário  
Caixa Postal 96 ● CEP 74605-010  
Goiânia ● Goiás ● Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br ● prope@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

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

Goiânia, 15 de setembro de 2010.

## 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), 991446-68/32153091 (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 consequências, 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

---

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.