

**UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE UM NOVO MÉTODO DE
TRIAGEM MOLECULAR DA SÍNDROME DO
CROMOSSOMO X FRÁGIL EM INDIVÍDUOS
BRASILEIROS**

Karen Maria de Carvalho Curtis

Dissertação de Mestrado
2010

Karen Maria de Carvalho Curtis

**AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE UM NOVO MÉTODO DE
TRIAGEM MOLECULAR DA SÍNDROME DO CROMOSSOMO X
FRÁGIL EM INDIVÍDUOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

Co-orientadora: Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

ARARAQUARA

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C978a	Curtis, Karen Maria de Carvalho Avaliação do emprego de um novo método de triagem molecular da síndrome do cromossomo X frágil em indivíduos brasileiros / Karen Maria de Carvalho Curtis. – Araraquara : [s.n], 2010 84f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli Co-orientador: Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga 1. Biotecnologia. 2. Síndrome do cromossomo X frágil. 3. Triagem diagnóstica. 4. <i>PCR</i> . I. Título.
-------	--

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

KAREN MARIA DE CARVALHO CURTIS

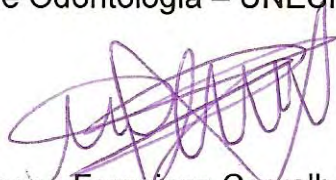
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 12 de agosto de 2010.

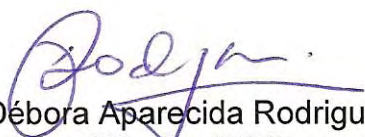
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga (Co-orientadora)
Faculdade de Odontologia – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu



Drª Débora Aparecida Rodrigueiro
Centro de Ciências Médicas e Biológicas - PUC, Sorocaba

DADOS CURRICULARES

Nome : Karen Maria de Carvalho Curtis
Nome em citações bibliográficas: CURTIS, K. M. C.
Sexo: feminino
Filiação: José Umberto Curtis e Sonia Aparecida de Carvalho Curtis
Nascimento: 14/05/1984 - Araraquara/SP - Brasil
Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho,
Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR
Rua Humaitá, 1680
Centro - Araraquara
14801-903, SP - Brasil
Telefone: 16 33016517

Formação Acadêmica/Titulação:

2008 Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação do emprego de um novo método de diagnóstico molecular da síndrome do cromossomo X frágil em indivíduos brasileiros
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli
Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2002 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
Título: Análise do consumo de água residencial em Matão/SP no período de 1999 a 2004
Orientador: Adalberto Cunha

Formação complementar:

2003 - 2005 Licenciatura.
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

Atuação profissional:

1. Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2008 - Atual	Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda, Carga horária: 40 Regimes: Dedicação Exclusiva
2007 - 2007	Estágio de Atualização na disciplina de Genética Humana do Departamento de Morfologia.
2006 - 2006	Estágio de Atualização na Disciplina de Genética Humana do Departamento de Morfologia.

Produção bibliográfica:

Artigos completos publicados em periódicos

1. VIANA, A. C., KIM, Y. J., CURTIS, K. M. C., RENZI, R., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Association of haplotypes in the CXCR2 gene with periodontitis in a Brazilian population. **DNA and Cell Biology**., v.29, p. 191-200, 2010.
2. ANOVAZZI, G., KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Polymorphism and haplotype in the IL4 gene are associated with chronic periodontitis in Brazilian population. **Journal of Periodontology** ., v.81, p. 392-402, 2010.
3. KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Lack of association of a functional polymorphism in the Interleukin 8 gene with susceptibility to Periodontitis. **DNA and Cell Biology**., v.28, p. 185-190, 2009.
4. VIANA, A. C., KIM, Y. J., CIRELLI, J. A., ORRICO, S. R. P., CURTIS, K. M. C., CANO, V.S., VALENTINI, S. R., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
A Novel PCR-RFLP Assay for the Detection of the Single Nucleotide Polymorphism at Position +1440 in the Human CXCR2 gene. **Biochemical Genetics**., v.45, p. 737-741, 2007.

Artigos aceitos para publicação

1. KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., MENDES-JUNIOR, C. T., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Association of haplotypes in the IL8 gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population. **Clinica Chemica Acta** (Print)., 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PIGOSSI, S., CURTIS, K. M. C., ALVIM-PEREIRA, F., TREVILATTO, P. C., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Associação do polimorfismo VNTR no gene IL4 com perdas múltiplas de implante dentário In: 63a. Jornada Odontológica e 23a. Jornada Acadêmica "Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho", 2009, Araraquara. **Revista Odontológica UNESP.**, 2009. v. 38.p. 18.
2. ANOVAZZI, G., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., KIM, Y. J., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Associação do polimorfismo -590 (C/T) do gene interleucina 4 com suscetibilidade à periodontite In: 26a. Reunião da SBPqO, 2009, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research.**, 2009. v.23. p. 181.
3. CURTIS, K. M. C., RODRIGUEIRO, D. A., RODRIGUES, V. C., LIPINSKI-FIGUEIREDO, E, SCAREL-CAMINAGA, R. M., CICARELLI, R. M. B.
Avaliação operacional de um novo método de triagem diagnóstica da síndrome do cromossomo X frágil em indivíduos brasileiros: resultados preliminares In: X Simpósio Nacional de Biologia Molecular aplicada à medicina, 2009, Ribeirão Preto. **X Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina.**, 2009.
4. VIANA, A. C., KIM, Y. J., CICARELLI, R. M. B., ORRICO, S. R. P., CURTIS, K. M. C., RENZI, R., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Associação de haplótipos do gene CXCR2 com periodontite em indivíduos brasileiros In: 25a. Reunião da SBPqO, 2008, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research.**, 2008. v.22. p.265.
5. ANOVAZZI, G., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Associação de polimorfismo no gene interleucina 4 com suscetibilidade a periodontite In: 25a. Reunião da SBPqO, 2008, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research.**, 2008. v.22. p.150.
6. KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., CIRELLI, J. A., ORRICO, S. R. P., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Haplotype association of interleukin-8 gene with susceptibility to Periodontitis In: Exhibition of the IADR, 2008, Toronto. **Journal of Dental Research.**, 2008. v.87. p.2712.
7. CORBI, S. C. T., CURTIS, K. M. C., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., Cirelli, J.A, SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação da associação do polimorfismo +781 (T/C) no gene interleucina 8 com suscetibilidade à periodontite In: 25a. Reunião da SBPqO, 2008, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research.**, 2008. v.22. p.264.

8. KIM, Y. J., SOGUMO, P. M., VIANA, A. C., Cirelli, J.A, ORRICO, S. R. P., CURTIS, K. M. C., RENZI, R., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação do polimorfismo +396 (T/G) do gene interleucina 8 em indivíduos com periodontite In: 25a. Reunião da SBPqO, 2008, Águas de Lindóia. **Brazilian Oral Research.**, 2008. v.22. p.206 - 206
9. SCAREL-CAMINAGA, R. M., CURTIS, K. M. C., RENZI, R., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A.
Metodologia Simples e Econômica para Genotipagem do Polimorfismo RS2227307 no Gene IL8 In: IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina, 2008, São Paulo. **IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina.** São Paulo: 2008.
10. CURTIS, K. M. C., RENZI, R., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., CANO, V. S. P., VALENTINI, S. R., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Utilização do ACRS como estratégia eficiente e econômica para genotipagem do locus +781 C/T (RS2227306) no gene IL8 In: X Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina, São Paulo. **IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina.** São Paulo: 2008.
11. VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CURTIS, K. M. C., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação do polimorfismo (+1440 G/A) do gene CXCR2 na Doença Periodontal Crônica. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e 2ª Reunião da Federação Latino americana/IADR, 2007, Atibaia - SP. **Brazilian Oral Research.**, 2007. v.21. p. 282.
12. KIM, Y. J., SCAREL-CAMINAGA, R. M., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., CIRELLI, J. A., ORRICO, S. R. P.
Investigação do polimorfismo -353 (A/T) do gene interleucina 8 em indivíduos com doença periodontal crônica In: 20ª JOB Jornada Odontológica de Bauru, 2007, Bauru - SP. **Anais da 20ª JOB Jornada Odontológica de Bauru.**, 2007. p. 470.
13. KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação dos polimorfismos (-353A/T) e (+678 T/C) do gene IL8 na Doença Periodontal Crônica. In: 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e 2ª Reunião da Federação Latino americana /IADR, 2007, Atibaia - SP. **Brazilian Oral Research.**, 2007. v.21. p. 218.
14. RENZI, R., SOGUMO, P. M., CURTIS, K. M. C., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Metodologia acessível para genotipagem do locus polimórfico +396 G/T do gene IL8 In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia - SP. **53º Congresso Brasileiro de Genética.**, 2007. p.146.

15. CURTIS, K. M. C., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Novo método PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +781 C/T do gene IL8
In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia - SP. **53º Congresso Brasileiro de Genética.**, 2007. p. 90.
16. CURTIS, K. M. C., MACERA, C.B.L., CAVALCANTE, L.B., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Novo método de PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +1440 G/A do gene CXCR2
In: 52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de la Asociación Latino americana de Genética, 2006, Foz do Iguaçu. **52º Congresso Brasileiro de Genética.**, 2006. p. 467.

Apresentação de Trabalho

1. CURTIS, K. M. C., RODRIGUEIRO, D. A., RODRIGUES, V. C., LIPINSKI-FIGUEIREDO, E, SCAREL-CAMINAGA, R. M., CICALLELLI, R. M. B.
Avaliação operacional de um novo método de triagem diagnóstica da síndrome do cromossomo X frágil em indivíduos brasileiros: resultados preliminares, 2009.
2. SCAREL-CAMINAGA, R. M., CURTIS, K. M. C., RENZI, R., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A.
Metodologia simples e econômica para genotipagem do polimorfismo RS2227307 no gene IL8, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
3. CURTIS, K. M. C., RENZI, R., CORBI, S. C. T., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., CANO, V. S. P., VALENTINI, S. R., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Utilização do ACRS como estratégia eficiente e econômica para genotipagem do locus +781 C/T no gene IL8, 2008.
4. VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CURTIS, K. M. C., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação do polimorfismo (+1440 G/A) do gene CXCR2 na Doença Periodontal Crônica, 2007.
5. KIM, Y. J., SCAREL-CAMINAGA, R. M., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., CIRELLI, J. A., ORRICO, S. R. P.
Investigação do polimorfismo -353 (A/T) do gene interleucina 8 em indivíduos com doença periodontal crônica, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. KIM, Y. J., VIANA, A. C., CURTIS, K. M. C., ORRICO, S. R. P., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Investigação dos polimorfismos (-353 A/T) e (+678 T/C) do gene IL8 na Doença Periodontal Crônica, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)

7. RENZI, R., SOGUMO, P. M., CURTIS, K. M. C., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Metodologia acessível para genotipagem do locus polimórfico +396 G/T do gene IL8, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. CURTIS, K. M. C., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., CIRELLI, J. A., SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Novo método PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +781 C/T do gene IL8, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. CURTIS, K. M. C., MACERA, C.B.L., CAVALCANTE, L.B., VIANA, A. C., KIM, Y. J., ORRICO, S. R. P., Cirelli, J.A, SCAREL-CAMINAGA, R. M.
Novo método de PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +1440 G/A do gene CXCR2, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Participação em eventos:

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **X Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina**, 2009.
Avaliação Operacional de um novo método de triagem diagnóstica da síndrome do cromossomo X frágil em indivíduos brasileiros: resultados preliminares.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina**, 2008.
Utilização do ACRS com a estratégia eficiente e econômica para genotipagem do locus +781 C/T (RS2227306) no gene IL8.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **53º Congresso Brasileiro de Genética**, 2007.
Novo método PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +781 C/T do gene IL8.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **52º Congresso Brasileiro de Genética e 12º Congresso de la Asociación Latino americana de Genética**, 2006.
Novo método de PCR-RFLP para genotipagem do locus polimórfico +1440 G/A do gene CXCR2.

Outras informações relevantes:

BOLSA DE TREINAMENTO TÉCNICO TT-3 concedida em 01/11/2006 para realização do Projeto: Investigação de Polimorfismos no gene Interleucina 8 e seus receptores em indivíduos com Doença Periodontal Crônica. Processo: 06/04492-1. O término da bolsa foi em 31/10/2007, porém obteve-se prorrogação da mesma até 31/12/2007, para término do Projeto.

REALIZAÇÃO DE CONCURSO PÚBLICO para provimento de vaga de Técnico de Laboratório na Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAR- UNESP, realizado pela VUNESP. Classificação Final: 3º lugar.

ARTIGOS ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO:

- 1- Association of the polymorphism rs2227307 in the Interleukin 8 gene with periodontitis. KIM, Y. J. ; SOGUMO, P. M. ; VIANA, A. C. ; CURTIS, K. M. C. ; ORRICO, S. R. P. ; CIRELLI, J. A. ; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Journal of Clinical Periodontology - CPE-08-08-1689
- 2- Detection of the Single Nucleotide Polymorphism (rs2227307) in the Human Interleukin 8 gene using a novel PCR-RFLP assay. KIM, Y. J. ; SOGUMO, P. M.; CURTIS, K. M. C.; RENZI, R.; VIANA, A. C.; CORBI, S. C. T.; ORRICO, S. R. P. ; SCAREL-CAMINAGA, R. M.
- 3- Haplotypes in the Interleukin 8 gene and their association with Chronic Periodontitis Susceptibility. SCAREL-CAMINAGA, R. M.; KIM, Y. J.; VIANA, A.C. ; CURTIS, K. M. C.; CORBI, S. C. T.; SOGUMO, P. Biochemical Genetics, Mar. 2010.

*À Deus, por ser meu guia hoje e sempre, me dar força e iluminar meus
caminhos;*

*Aos meus pais Sonia e José Umberto, e a minha irmã Amanda, por
serem meu refúgio nas horas difíceis, pelo amor e pelo incentivo;*

*À meu noivo Loitson, pela paciência, apoio, carinho e compreensão em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli pela orientação, paciência e confiança, além da contribuição na minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, por ter proporcionado-me a oportunidade de entrar na vida acadêmica, a partir do momento que abriu as portas de seu laboratório para que eu fizesse estágio; por ensinar a maioria das coisas que sei sobre biologia molecular e vida acadêmica; por acreditar e confiar em meu trabalho; pelo incentivo desde o início; pela contribuição em minha formação acadêmica e pessoal; e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Valter Curi Rodrigues, por introduzir a ideia de realização deste projeto, por confiar em nosso trabalho para o desenvolvimento do mesmo e por encaminhar os pacientes que participaram do projeto.

À Profa. Dra. Débora Aparecida Rodrigueiro, por confiar em meu trabalho, mesmo sem conhecer-me; pela ajuda nos contatos com a Profa. Ângela Maria Vianna Morgante do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva (IB/USP); pelo apoio durante todo o projeto; e por sempre estar disposta à ajudar, independente do dia hora e condições.

À Profa. Dra. Ângela Maria Vianna Morgante (IB/USP), pela doação das amostras utilizadas neste projeto e por disponibilizar seu laboratório para desenvolvimento da técnica quando houve necessidade.

Ao Prof. Dr. Sílvio Govone, pela colaboração na escolha do método estatístico e na aplicação da análise, bem como na interpretação dos resultados.

À meus pais e minha irmã, que sempre me incentivaram na vida e nos estudos, apóiam minhas decisões e são meus “pilares de sustentação”.

À minha mãe, em especial, por agüentar minhas lamurias e sempre interceder a Deus pelas minha realizações.

Ao Loitson, por apoiar meu trabalho, ser o motorista das viagens, aguentar minhas reclamações, pela paciência e compreensão e por me incentivar sempre.

À Fátima do IB-USP, pela realização do SB, pela troca de idéias, assim como pela amizade.

À Sílvia do IB-USP, pela contribuição no envio das amostras pela troca de idéias, assim como pela amizade.

À Renata de Aquino do Laboratório de Citologia da UNIARA, por ajudar na idealização do trabalho, estar presente no início dos trabalhos e pela amizade.

À Suzane, Lívia, Sâmia, Gabriella e Giovana, amigas do laboratório, pelo apoio nas horas difíceis da pesquisa, pela mão amiga, pela contribuição em vários momentos, por me ouvirem nos momentos complicados, e principalmente, pela amizade.

À Margareth, por ajudar nos momentos burocráticos, por ser uma boa ouvinte, assim como pela amizade.

À todos os amigos que mesmo distante torceram por mim e deram incentivo e apoio ao meu trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado.

RESUMO

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF) é a forma mais comum de deficiência mental herdada. A doença ocorre pela expansão das repetições de trinucleotídeos na região 5' não traduzida do gene *FMR1* no cromossomo X. Dependendo do número de repetições CGG originam-se 4 tipos de alelos: normal (NL), pré-mutado (PM), *gray zone* (GZ) e mutação completa (FM). A instabilidade e expansão das repetições, aliado à metilação do DNA, causam a diminuição ou ausência na produção da proteína FMRP, a qual é essencial para a função cerebral. O diagnóstico da SXF tem sido realizado principalmente por análise molecular *Southern blot*. Porém, este método é trabalhoso, demorado e de custo elevado. Recentemente foi desenvolvido um novo método molecular para triagem da SXF por *PCR*, que segundo os autores, é rápido, de baixo custo, e eficiente na detecção das repetições CGG em homens e mulheres. No entanto, notou-se a ausência de informações importantes para reprodução do método. Os objetivos deste estudo foram: (i) padronizar a técnica de *PCR* proposta por Tassone et al., (2008), adaptando-a, devido a carência de informações metodológicas; (ii) comprovar a exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade do método, comparando-a ao *Southern blot*; (iii) avaliar a aplicação da técnica utilizando DNA extraído de diferentes materiais biológicos/métodos de extração; (iv) estimar o custo e o tempo de execução do método no mercado nacional. Os materiais biológicos utilizados foram: sangue coletado por sistema à vácuo e células da mucosa oral, que foram extraídos por solventes orgânicos e sangue coletado em *cartões FTA*, purificado pelo *kit Whatman*. Obteve-se sucesso na reprodução do método da *PCR* em 75 indivíduos utilizando a enzima *Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics)*. A exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade foram 100% quando analisada a casuística total, indicando que a técnica consegue detectar a presença de todos os alelos da SXF. Porém, quando os alelos PM e FM foram analisados separadamente, houve diminuição da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade, provavelmente por que o método da *PCR* não conseguiu diferenciar os alelos PM e FM de 5 indivíduos (6,7%), comparando-se com o *Southern Blot*. Houve reprodutibilidade da técnica com DNA extraído de diferentes materiais biológicos. O custo aproximado para a realização da triagem por *PCR* no mercado nacional, considerando a coleta com cartão *FTA* é de R\$ 9,00 com demanda de 11 horas. Portanto, verificou-se que o método é eficiente como triagem da SXF, além de rápido e de baixo custo. Conclui-se que o método da *PCR* é eficiente como triagem da SXF, no entanto, o *Southern blot* continua configurando o método padrão-ouro para diagnóstico, devendo ser aplicado em casos para os quais não

obteve-se resultado por *PCR*, ou naqueles em que se deseja determinar o tamanho dos alelos e/ou o estado de metilação dos mesmos.

Palavras-chave: Síndrome do cromossomo X frágil. Triagem diagnóstica. *PCR*.

ABSTRACT

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common form of inherited mental retardation. The disease occurs by the expansion of triplet nucleotide repeats in the 5' untranslated of the *FMR1* gene on chromosome X. Depending on the number of CGG repeats four types of alleles originate from it: normal (NL), pre-mutated (PM), gray zone (GZ) and full mutation (FM). The instability and expansion of these repetitions, together with the methylation of DNA, cause a decrease or absence in the production of the protein FMRP, which is essential for the brain function. The diagnosis of FXS has been done mainly by molecular analysis Southern blot. However, this method is laborious, time consuming and expensive. Recently we have developed a new molecular method for FXS screening by PCR, which according to the authors, is rapid, inexpensive, and efficient in the detection of CGG repeats in male and female. However, we noted the absence of important information for breeding method. The objectives of this study were: (i) to standardize the PCR technique proposed by Tassone et al. (2008), adapting it, due to the lack of methodological information, (ii) verify the accuracy, sensitivity and specificity of the method, comparing it to the Southern blot, and (iii) to evaluate the technique using DNA extracted from different biological materials / extraction methods, and (iv) estimate the cost and time of the method execution in the domestic market. The biological materials used were: blood collected by vacuum system and oral mucosal cells, which were extracted by organic solvents and blood collected on FTA cards, purified by Whatman kit. Success was achieved in the reproduction of the PCR method in 75 individuals using the enzyme Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics). The accuracy, sensitivity and specificity were 100% when analyzing the total sample, indicating that the technique can detect the presence of all alleles of FXS. However, when the PM and FM alleles were analyzed separately, there was a decrease in accuracy, sensitivity and specificity, probably because of the PCR method did not differentiate the PM and FM alleles of five individuals (6.7%) compared with the Southern blot. There was reproducibility of the technique with DNA extracted from different biological materials. The approximate cost to carry out the screening by PCR in the domestic market, considering the FTA collection card is \$ 9.00 with a demand of 11 hours. Therefore, it was found that the method is efficient as screening of FXS, as well as fast and with a low cost. It is concluded that the PCR method is as effective as screening of FXS, however, the Southern blot is still setting the gold standard for diagnosis and should be applied in cases in which no result was obtained by PCR, or in those which the size of the alleles and / or the methylation status need to be determined.

Key words: Fragile X Syndrome. Screening test. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Representação esquemática do gene <i>FMR1</i>	27
Figura 2 - Representação dos alelos da SXF	28
Figura 3 - Representação esquemática da região inicial do gene <i>FMR1</i>	32
Figura 4 – Representação do gene <i>FMR1</i> e da proteína FMRP	33
Figura 5 – Representação esquemática do mRNA do gene <i>FMR1</i> e da proteína FMRP	34
Figura 6 – Esquema do método da 2ª PCR para resolver a aparente homozigose de mulheres	54
Figura 7 – Esquema do cálculo da exatidão, sensibilidade e especificidade	56
Figura 8 - Gel de agarose 2% ilustrando os resultados iniciais da 1ª PCR e 2ª PCR	57
Figura 9 - Gel de agarose 2% ilustrando resultados do método utilizando a enzima <i>FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics)</i> .	58
Figura 10 – Heredograma da família 1	59
Figura 11 – Heredograma da família 2	60
Figura 12 - Gel de agarose a 2% contendo resultados das duas PCRs de amostras de DNA de mesmo indivíduo do gênero feminino portadora de alelos normais para a SXF	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos alelos da SXF	27
Tabela 2 - Resultados das triagens por <i>PCR</i> e dos diagnósticos por <i>Southern blot</i>	61
Tabela 3 - Informação da triagem por <i>PCR</i> e do diagnóstico por <i>Southern blot</i> dos indivíduos apresentados nas figuras 11 e 12	63
Tabela 4 - Resultados da exatidão, sensibilidade e especificidade	64
Tabela 5 – Estimativa de custo e tempo para realização do método da <i>PCR</i> por paciente	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

³²P – Fósforo 32

ADHD – Déficit de Atenção e Transtorno de Hiperatividade

ADOS – *Autism Diagnosis Observation Schedule*

CC – *Coiled Coil*

CpG - Citosina, fosfato, guanina

CYFIP - *Citoplasmatic FMR1 Interacting Protein*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Dexoxinucleotídeo trifosfato

DSM – IV – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*

FM – *Full Mutation*

FMR1 – *Fragile X Mental Retardation 1 Gene*

FMRP – *Fragile X Mental Retardation Protein*

FRAXA – *Fragile site, X chromosome, A site*

FXR1P – *Fragile X Related Protein 1*

FXS - *Fragile X Syndrome*

FXTAS – *Fragile X-associated Tremor Ataxia Syndrome*, Síndrome de Tremor Ataxia associada ao X Frágil

GABA – *Gamma - aminobutyric acid*

GZ – *Gray Zone*

HCl – Ácido Clorídrico

hn RNP - *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*

Kb - Kilobases

kD - kiloDalton

KH – *K Homology*

M – molar

mGluR5 – *Meyabotropic Glutamate Receptor 5 Pathway*

min – minutos

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

mRNA – Messenger RNA, RNA mensageiro

MS-PCR – *Methylation Specific PCR*, PCR Específica para Metilação

NES – *Nuclear Exportation Sign*, Sinal de Exportação Nuclear

ng – nanograma

NL – *Normal*

NLS – *Nuclear Localization Sign*, Sinal de Localização Nuclear

NUFIP – *Nuclear FMRP Interacting Protein*

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Pfu – *Proofreading Enzyme*

PM – *Pre Mutation*

POI – *Primary Ovarian Insufficiency*, Insuficiência Prematura dos Ovários

POF – *Primary Ovarian Failure*, Falha Prematura dos Ovários

PSD95 – *Post-synaptic density protein-95*,

PTEN – *Phosphatase and Tensin Homolog*,

QI – *Quotient Intelligence*, Quociente de Inteligência

RGG box – *region rich in Arginine and Glycine residues*,

RNA – *Ribonucleic Acid*, Ácido Ribonucléico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – Reverse Transcription PCR, PCR de Transcrição Reversa

SB – *Southern blot*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SXF – Síndrome do cromossomo X Frágil

SHANK – *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2*

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

U – unidade

UTR – *Untranslated Region*, Região não traduzida

V – Volts

Xq27.3 – Braço curto do cromossomo X, região 2, banda 7, sub banda 3

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Síndrome do cromossomo X frágil	26
2.2 O gene <i>FMR1</i>	26
2.2.1 Classes de alelos e decorrente classificação clínica dos indivíduos	27
2.2.2 Estabilidade dos alelos durante a transmissão de repetições CGG	28
2.2.3 Herança e padrões de transmissão do gene	30
2.2.4 Padrões de mosaicismo em repetições de CGG e metilação	31
2.2.5 Influência das repetições CGG na transcrição do gene <i>FMR1</i>	31
2.3 A proteína FMRP	32
2.3.1 Estrutura e expressão protética	32
2.3.2 FMRP: RNAs alvos e interação com proteína	34
2.3.3 Algumas funções descritas da FMRP	35
2.4. Correlação genótipo-fenótipo	35
2.4.1 Fenótipos cognitivos em indivíduos com alelo FM da SXF	36
2.4.2 Fenótipos comportamentais e psicológicos em indivíduos com alelos FM da SXF	37
2.4.3 Fenótipos físicos em indivíduos com FM	38
2.4.4 Relação das características entre indivíduos portadores da FM e autismo	39
2.4.5 Fenótipos em indivíduos com PM	40
2.4.6 Fenótipos em indivíduos com GZ	41
2.5 Prevalência populacional da SXF	41
2.6 Diagnósticos laboratoriais da SXF	42
2.6.1 Indivíduos que devem ser testados para a SXF	46
2.6.2 Aconselhamento genético e tratamento da SXF	46
2.7 Justificativa e relevância do projeto	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivos secundários	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Casuística	50
4.2 Obtenção do DNA	50
4.2.1 Cartão <i>FTA (Whatman)</i>	50

4.2.2 Sangue coletado pelo sistema à vácuo e DNA extraído com solventes orgânicos	51
4.2.3 Células da mucosa oral e DNA extraído com solventes orgânicos	52
4.3 PCR para diagnóstico de alelos NL PM e FM (1ª PCR)	52
4.4 PCR para diagnóstico conclusivo de mulheres que apresentam uma única banda na faixa da normalidade e homens com ausência do produto amplificado (2ª PCR)	54
4.5 Análise Estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Análise e escolha da melhor enzima para a realização do método	57
5.2 Comprovação da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade do método	59
5.3 Avaliação da aplicação do método adaptado de Tassone et al., (2008), utilizando DNA obtido de diferentes materiais biológicos	65
5.4 Estimativa do custo do método no mercado nacional e do tempo necessário de execução	67
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF) (OMIM 300624) é a forma mais comum de deficiência mental herdável. A prevalência estimada dessa síndrome, tanto no gênero masculino como no feminino é de 1:2500 (HAGERMAN, 2008).

O gene envolvido, denominado *FMR1*, está localizado na região Xq27.3 designada sítio *FRAXA*. O gene *FMR1* é altamente conservado e consiste em 17 exons (EICHLER et al., 1993). Na região 5' não traduzida (5'-UTR, *untranslated region*) do exon 1, ocorrem repetições em *tandem* de trinucleotídeos CGG (JIN; WARREN, 2000). A SXF origina-se pela instabilidade e expansão das repetições CGG, aliados à ocorrência de metilação.

O número de repetições CGG existentes no gene *FMR1* é polimórfico. Devido a este fato, originam-se 4 classes diferentes de alelos para a SXF: normais (NL), *gray zone* (GZ) pré-mutação (PM) e mutação completa (FM) (MADALENA et al., 2001; CRAWFORD et al., 2001; HAGERMAN e HAGERMAN, 2004; SOFOCLEUS et al., 2009).

Na SXF, durante a transmissão dos alelos para as próximas gerações, podem ocorrer alterações de aumento ou diminuições (OBERLÉ et al., 1991; FU et al., 1991; e CHIURAZZI et al., 1994) no número de repetições CGG. Essas alterações estão relacionadas à classe de alelo (NL, ZG, PM ou FM) envolvida na transmissão.

Os padrões de transmissão genética na SXF ocorrem diferentemente em homens e mulheres, devido ao fato das mulheres apresentarem dois cromossomos X, enquanto os homens apresentam apenas um. Assim, em geral, as mulheres que apresentam alelos PM com pelo menos 56 repetições CGG (NOLIN et al., 2003) transmitirão um alelo expandido FM para metade de seus descendentes. Em homens, a transmissão genética de alelos PM para alelo expandido FM somente poderá ocorrer em caso de geração de descendentes do sexo feminino; porém, esse evento é raro.

Os alelos FM do gene *FMR1* são instáveis não somente na transmissão entre as gerações, mas também nos tecidos de pacientes com SXF (instabilidade somática) (QUEIROZ, 2006). Essa instabilidade leva a um dos dois tipos de mosaicismo na SXF: o mutacional e o de metilação (GARDNER; SUTHERLAND, 2004).

O gene *FMR1* codifica uma proteína ligante de RNAs (BARDONI e MANDEL, 2002; LOU et al., 2010), denominada FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). A diminuição ou ausência da proteína FMRP é considerada a causa das características clínicas da SXF (FU et al., 1991; JACQUEMONT et al., 2003). Essa proteína é expressa em muitos tecidos (BASSEL; WARREN, 2008), sendo essencial para a função cerebral normal (JIN; WARREN, 2000).

A SXF manifesta características clínicas diferentes para o gênero masculino e feminino. Tais características abrangem distúrbios médicos e psiquiátricos principalmente em indivíduos com alelos PM e FM (pacientes com alelos ZG podem apresentar algumas deficiências, dificuldades de aprendizado e distúrbio comportamental (MITCHELL et al., 2004). Esses distúrbios podem ser divididos em: cognitivos, comportamentais, psicológicos e morfológicos (CHONCHAIYA et al., 2009). É importante ressaltar que o autismo tem relação com a SXF, sendo que algumas características clínicas são mais severas em indivíduos que têm a SXF associada ao autismo, do que em indivíduos que manifestam somente a SXF (ROGERS et al., 2001; KAUFMANN et al., 2004; ROBERTS et al., 2007).

As características clínicas da SXF podem ser comuns a outros casos de atraso e distúrbios gerais de desenvolvimento, por isso é necessária a confirmação da mesma por meio de exame genético. Muitas técnicas para identificação da SXF já foram relatadas na literatura, dentre elas, os testes moleculares (ROUSSEAU et al., 1991; HADDAD et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007; TASSONE et al., 2008; DODDS et al., 2009).

Os testes moleculares são importantes para identificar os alelos PM e FM da SXF, e dessa forma, diagnosticar corretamente a doença, pois o conhecimento da herança genética é importante para facilitar a intervenção precoce nos transtornos (HAGERMAN; HAGERMAN, 2008). Os métodos moleculares convencionais para diagnóstico da SXF são a *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) e o *Southern blot*. O *Southern blot* é o método padrão-ouro para diagnóstico da SXF, porém é trabalhoso e de alto custo. Assim, a maioria dos laboratórios realiza a *PCR* como método de triagem da SXF e o *Southern blot* somente em amostras que deixaram dúvida pela *PCR* (SALUTO et al., 2005).

O emprego da *PCR* para a triagem de indivíduos com SXF sofre algumas dificuldades metodológicas. Em face dessas dificuldades vários autores propuseram modificações no método da *PCR* (HADDAD et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007). Recentemente, Tassone et al. (2008) apresentaram um novo método da *PCR* para triagem da SXF que parece ser revolucionário, pois somente a *PCR* resolveria a maioria dos casos de suspeita da síndrome (afetados ou portadores de alelos PM ou FM, de ambos os sexos, inclusive mosaicos). Assim, o *Southern Blot* seria empregado somente em casos raros para os quais não foi possível obter diagnóstico por *PCR* e em casos que seja importante saber se os alelos estão metilados. Além disso, o método de Tassone et al. (2008) parece ser simples, de baixo custo e utiliza pouca quantidade de DNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Síndrome do cromossomo X frágil

Em 1953, Martin e Bell descreveram uma forma de retardo mental ligada ao cromossomo X em membros de uma mesma família, a qual foi denominada síndrome de Martin-Bell. Alguns anos depois, observou-se que um sítio frágil no braço longo do cromossomo X manifestava-se em amostras de indivíduos afetados pela síndrome de Martin-Bell cultivadas em meios de cultura deficientes em ácido fólico (LUBS, 1969), de forma que a síndrome passou a ser conhecida como síndrome do cromossomo X frágil.

A síndrome do cromossomo X frágil envolve o sítio frágil denominado *FRAXA* (*Fragile site, X chromosome, A site*) localizado no cromossomo Xq27.3. Neste sítio está o gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) (OMIM 309550). O fenótipo da SXF está associado a mutações no gene *FMR1* e abrange um amplo espectro de envolvimento físico e comportamental, refletindo sua expressividade clínica variável (NELSON, 1995).

A proteína FMRP é altamente conservada em vertebrados e largamente expressa. Observa-se particular expressão em ovário, timo, olhos, epitélio esofágico e do baço, com abundante expressão no cérebro e testículos. Moderada expressão de FMRP foi demonstrada no colo do útero, tireóide e fígado (D' HULST; KODY, 2009). No cérebro, a expressão de FMRP é restrita à diferenciação de neurônios sendo ausente em células nervosas não neuronais (DEVYS et al., 1993).

2.2 O gene *FMR1*

O gene *FMR1* é altamente conservado e consiste de ~38 Kilobases (Kb) (EICHLER et al., 1993). Composto por 17 exons (Figura 1), o gene apresenta, em sua região 5' não traduzida (*5'-UTR, untranslated region*) do exon 1, repetições em *tandem* de trinucleotídeos CGG (JIN; WARREN, 2000). A SXF origina-se pela instabilidade e expansão das repetições CGG, aliados à ocorrência de metilação.

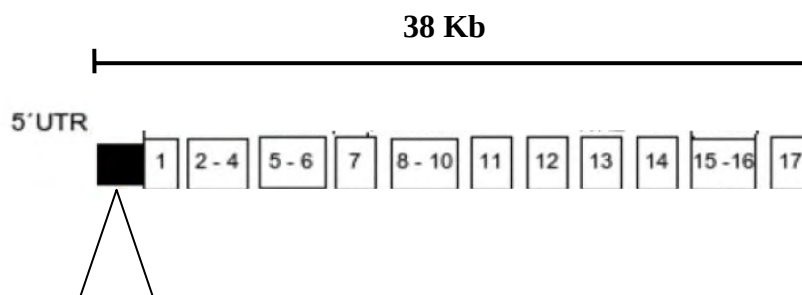


Figura 1. Representação esquemática do gene *FMR1*. Os 17 exons do gene estão representados pelos retângulos numerados. O triângulo indica o local das repetições CGG (Modificado de Schneider et al., 2009).

2.2.1 Classes de alelos e decorrente classificação clínica dos indivíduos

O número de repetições CGG existentes no gene *FMR1* é polimórfico. Devido a este fato, originam-se 4 classes diferentes de alelos para a SXF: normais (NL), *gray zone* (GZ) pré-mutação (PM) e mutação completa (FM) (MADALENA et al., 2001; CRAWFORD et al., 2001; HAGERMAN; HAGERMAN, 2004; SOFOCLEUS et al., 2009). Embora o número de repetições CGG considerada para a classificação clínica da SXF apresente uma pequena variação entre diferentes autores, considera-se em média: (i) de 5 a 44 repetições CGG, indivíduos portadores de alelos normais (NL); (ii) de 45 a 54 repetições, indivíduos portadores de alelos em zona de *gray* (ZG); (iii) de 55 à 200 repetições, indivíduos portadores de alelos pré-mutados (PM); (iv) acima de 200 repetições, indivíduos portadores de alelos completamente mutados (FM) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos alelos da SXF.

Número de repetições CGG	Classificação
5 à 44	Normal
45 à 54	<i>Gray zone</i>
55 à 200	Pré-mutação
> 200	Mutação completa

Obs: Os limites entre as classificações devem considerar as características clínicas e histórico familiar do paciente analisado.

Alguns autores consideram a existência de alelo em zona de transição, quando este apresenta de 45 à aproximadamente 60 repetições (NOLIN et al, 2003; RODRIGUEIRO, 2006). Porém, um caso descrito recentemente por FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009, demonstra a geração de um alelo expandido com 538 repetições de CGG em um menino, cuja

a mãe apresenta alelo com 56 repetições CGG. Isso comprova a instabilidade de alelos com pequena expansão de repetições. Por isso é importante considerar as características clínicas e o histórico familiar de cada indivíduo, pois pequenas diferenças no número de repetições CGG (por exemplo, quatro ou cinco repetições), provavelmente não definem a classificação dos indivíduos para a SXF (HAGERMAN e HAGERMAN, 2002).

A figura 2 apresenta, esquematicamente, os alelos NL, PM e FM do gene *FMR1*.

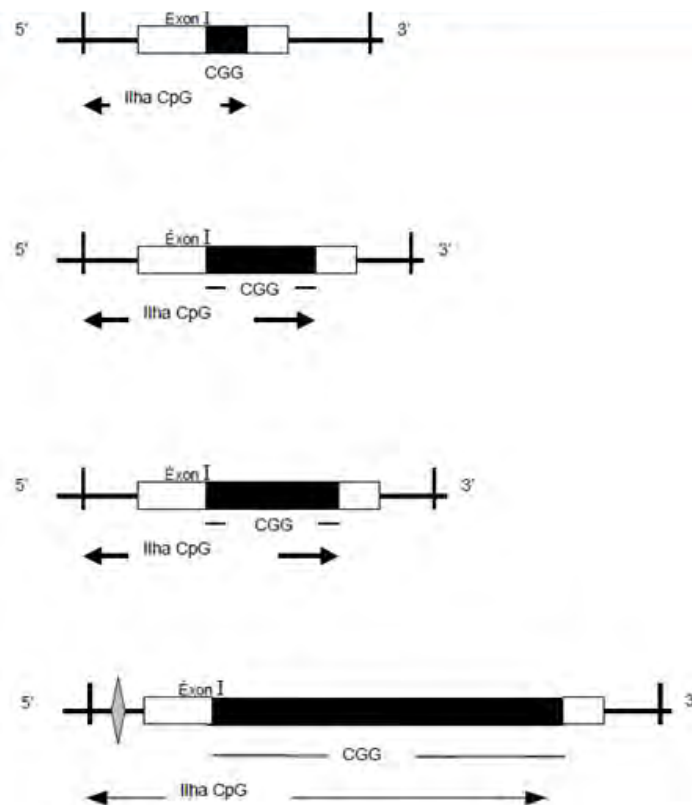


Figura 2. Representação dos alelos da SXF. A imagem esquematiza o fragmento obtido com a enzima *Pst I* (barras verticais). A ilha CpG, com o exon 1 e as repetições CGG inseridos, é indicada. (A) Alelo NL do gene *FMR1* com cerca de 30 repetições CGG. (B) Alelo ZG com cerca de 45 cópias CGG. (C) Alelo PM com cerca de 90 repetições CGG. (D) Alelo FM com mais de 200 repetições CGG. O losango indica a localização de possíveis sítios de restrição sensíveis à metilação (modificado de RODRIGUEIRO, 2006).

2.2.2 Estabilidade dos alelos durante a transmissão de repetições CGG

Na SXF, durante a transmissão dos alelos para as próximas gerações, podem ocorrer alterações no número de repetições CGG. Essas alterações estão relacionadas à classe do alelo (NL, ZG, PM ou FM) envolvida na transmissão. Geralmente as alterações são de aumento no número de repetições CGG. Porém podem ocorrer alterações em que o número de repetições

CGG diminui, como é relatado pelos autores Oberlè et al. (1991); Fu et al. (1991) e Chiurazzi et al. (1994).

Os alelos considerados normais (NL) para a SXF possuem, em média, um número entre 29 e 30 repetições CGG e apresentam inserções de trincas AGG após cada 9 ou 10 repetições (MADALENA et al., 2001; SULLIVAN et al., 2002; SOFOCLEUS et al., 2009). Essas inserções geram estabilidade para o gene, principalmente no momento da replicação (EICLHER e HOLDEN et al., 1994; MADALENA et al., 2001). Assim, tendem a serem transmitidos para as próximas gerações, sem expansões.

Alelos conhecidos como zona de transição (ZG) podem ser citados, na literatura, como alelos intermediários (NOLIN et al., 2003). Esses alelos podem apresentar instabilidade, ocasionando expansão no número de repetições CGG nas gerações subseqüentes. No entanto, a possibilidade de instabilidade nesses alelos não é conhecida (NOLIN et al., 2003; RODRIGUEIRO, 2006).

Os alelos pré-mutados (PM) não apresentam metilação (ou apresentam metilação parcial) de forma que a transcrição e tradução do gene *FMR1* não são prejudicadas. Porém esses alelos são extremamente instáveis durante a transmissão para as próximas gerações, principalmente em mulheres pré-mutadas (BASSEL; WARREN, 2008). Essa instabilidade origina alelos expandidos de mutação completa (FM), que são caracterizados por possuírem mais de 200 repetições CGG (FU et al., 1991). O risco de expansão das pré-mutações está relacionado, diretamente, ao tamanho real das repetições CGG (FU et al., 1991; HEITZ et al., 1992; BASSEL; WARREN, 2008). Segundo Heitz et al. (1992) e Nolin et al. (2003), mulheres com mais de 100 repetições CGG têm mais de 95% de chance de transmitir o alelo PM, originando a partir dele, alelos completamente mutados (FM). Isso explica o chamado “Paradoxo de Sherman” onde ocorre aumento da incidência de indivíduos com deficiência mental ao longo de sucessivas gerações de família portadora da SXF (SHERMAN et al., 1984). Alelos PM com menor tamanho dos quais se originaram alelos expandidos FM, registrados na literatura, até o momento, são de 56 e 59 repetições CGG (NOLIN et al., 2003; FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009). Alguns autores descreveram a existência de alelos PM que possuem apenas uma ou nenhuma inserção de AGG em ao longo das repetições de CGG (ZHONG et al., 1996; NOLIN et al., 2003). Alelos que não apresentam inserções AGG ao longo das repetições CGG tem mais propensão de gerar expansões do que alelos com inserções AGG na sequência do gene (JIN; WARREN, 2000).

Os alelos FM também são instáveis e suas seqüências tornam-se anormalmente hipermetiladas, o que resulta no silenciamento do gene *FMR1*, levando à inibição da

expressão genética (FU et al., 1991; JIN; WARREN, 2000). A hipermetilação dos alelos FM não ocorre somente nas repetições CGG, mas também, em todos CpGs localizados nas regiões que flanqueiam as repetições CGG, incluindo a região promotora do gene (COFEE et al., 2009).

É possível observar que, em relação à estabilidade, os alelos PM e FM apresentam distinções perceptíveis. Entre os alelos PM e ZG é difícil estabelecer um limite de diferenciação. Mesmo assim é importante ressaltar que não devem-se aceitar como definitivas e inquestionáveis as distinções entre os alelos (RODRIGUEIRO, 2006).

Durante a transmissão dos alelos é muito raro observar diminuições no tamanho das repetições CGG (MINGRONI-NETTO et al., 1996). Porém já foram descritos casos em que o tamanho do alelo FM na prole era menor que o alelo FM da progenitora (OBERLÉ et al., 1991; CHIURAZZI et al., 1994). Van Der Ouwenland et al. (1994) apresentaram um caso de diminuição de um alelo PM para um alelo NL em uma filha de mãe portadora de alelo PM.

Recentemente, Tabolacci et al. (2008), descreveram um caso em que a progenitora apresenta alelo PM de 190 repetições CGG e o filho possui alelo diminuído NL de 43 repetições CGG. Esse é o primeiro caso, na literatura, de redução no tamanho do alelo PM resultando em um alelo NL, em transmissão vertical de homem-mulher, sem que haja mosaïcismo.

2.2.3 *Herança e padrões de transmissão do gene*

Os alelos PM em mulheres geralmente tendem a gerar alelos expandidos de FM nos descendentes (HEITZ et al., 1992; NOLIN et al., 2003; BASSEL; WARREN, 2008); e os alelos FM são completamente instáveis durante a transmissão genética.

Em geral, as mulheres que apresentam alelos PM com pelo menos 56 repetições CGG (NOLIN et al., 2003) transmitirão um alelo expandido FM para metade de seus descendentes. Exceção a esse fato foi descrita por Tabolacci et al. (2008) quando descreveram um caso de uma mulher com um alelo PM de aproximadamente 190 repetições CGG que gerou um filho com um alelo NL de 43 repetições CGG. Em homens, a transmissão genética de alelos PM para alelo expandido FM somente poderá ocorrer em caso de geração de descendentes do sexo feminino. Porém, esse evento é raro; tipicamente o homem pré-mutado portador de PM passa para as suas filhas somente alelo PM, com pequenas expansões ou contrações (ZEESMAN et al., 2004).

2.2.4 Padrões de mosaicismo em repetições de CGG e metilação

Os alelos FM do gene *FMR1* são instáveis não somente na transmissão entre as gerações, mas também nos tecidos de pacientes com SXF (instabilidade somática) (QUEIROZ, 2006). Essa instabilidade leva a um dos dois tipos de mosaicismo na SXF: o mutacional e o de metilação (GARDNER; SUTHERLAND, 2004).

No mosaicismo mutacional os indivíduos apresentam uma linhagem celular que contém o alelo FM em co-concorrência com outra linhagem celular onde há alelo PM não metilado e funcional. A ocorrência de linhagem normal em conjunto com outra linhagem que possua o alelo PM ou o alelo FM é rara (RODRIGUEIRO, 2006).

O mosaicismo de metilação ocorre em casos onde há a presença de alelo FM, porém o DNA não está metilado em todas as células (RODRIGUEIRO, 2006). Em mulheres com alelos NL, uma das duas cópias do gene *FMR1* é metilada devido à inativação do cromossomo X (KIRCHGESSNER et al., 1995). Assim, mulheres normais têm alelos metilado e não metilado, na razão de 1:1. Em mulheres portadoras de FM, sem considerar a inativação do cromossomo X, a razão de alelos metilado e não metilado pode variar de 1:1 (50%:50%) para 3:1 (75%:25%) (COFEE et al., 2009). Essas observações indicam que a expansão das repetições CGG e a metilação são eventos separados, cuja associação não é muito clara (JIN; WARREN, 2000).

2.2.5 Influência das repetições CGG na transcrição do gene *FMR1*.

A transcrição do gene *FMR1* pode ser iniciada em três sítios diferentes (I, II ou III) ao longo do promotor (BEILINA et al., 2004) (Figura 3). A seleção do sítio de iniciação da transcrição é influenciada pelos elementos CGG. Assim, quanto maior a repetição, ocorre o predomínio da utilização de sítios iniciadores mais distais à repetição (BEILINA et al., 2004). Smith et al. (2004), especulam que o local de início da transcrição influencia nos níveis de RNA mensageiro (mRNA) em pacientes portadores de alelo PM.

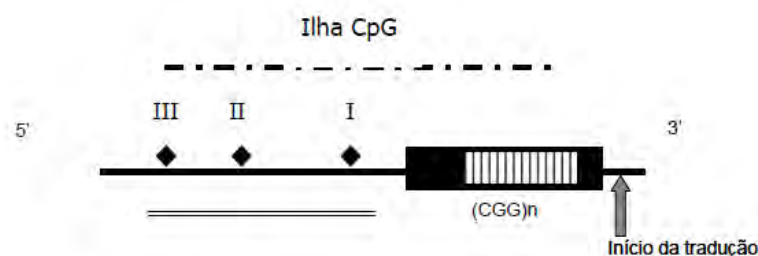


Figura 3. Representação esquemática da região inicial do gene *FMR1*. O promotor do gene e a maior parte do éxon 1 estão inseridos na ilha CpG indicada pela linha pontilhada. Os sítios de transcrição (I, II e III) representados por losangos, são requeridos de acordo com o tamanho da repetição CGG (retângulo hachurado). O retângulo negro representa o éxon 1, onde está inserida a repetição CGG. A seta simboliza o início da tradução. (Retirada de RODRIGUEIRO, 2006).

2.3 A proteína FMRP

2.3.1 Estrutura e expressão protéica

O gene *FMR1* codifica uma proteína ligante de RNAs (BARDONI; MANDEL, 2002; LUO et al., 2010) com 631 kilodaltons (kD), denominada FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). A diminuição ou ausência da proteína FMRP é considerada a causa das características clínicas da SXF (FU et al., 1991; JACQUEMONT et al., 2003). A proteína é expressa em muitos tecidos (BASSEL; WARREN, 2008) sendo essencial para a função cerebral normal (JIN; WARREN, 2000).

A transcrição do gene *FMR1* gera um transcrito da ordem de 4,4 Kb (EICHLER et al., 1993). O processamento do transcrito apresenta alternativas diferentes, dando origem a mais de 12 isoformas da proteína (D'HULST; KODY, 2009; XIE et al., 2009). Cada isoforma da proteína liga RNAs diferentes, resultando em proteínas com diferentes afinidades (DENMAN et al., 2002). A especificidade dessas isoformas no desenvolvimento da SXF, vem sendo estudada (BECHARA et al., 2006; XIE et al., 2009; BANERJEE et al., 2010).

Na proteína FMRP existem três domínios: KH1, KH2 (*hn RNP K-protein homology*) e um domínio de arginina-glicina-glicina (*RGG box*) (BARDONI; MANDEL, 2002; BASSEL; WARREN, 2008; OOSTRA et al., 2009). Há ainda, um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de exportação nuclear (NES) (EBERHART et al., 1996; BARDONI et al., 1997; BASSEL; WARREN, 2008). A existência dos domínios KH1, KH2 e *RGG box* indica que a proteína é ligante de RNA (SIOMI et al., 1993). Os sinais NLS e NES sugerem que a proteína FMRP tem um importante papel no transporte (do núcleo para o citoplasma) de muitos mRNAs alvo, podendo atuar na regulação da tradução de tais mRNAs (BARDONI; MANDEL, 2002; BASSEL; WARREN, 2008).

A figura 4 apresenta o gene *FMR1* e a proteína FMRP apresentando os sítios de processamento alternativo do gene (que gera as diferentes isoformas da proteína); os domínios de ligação de RNAs (KH1, KH2 e *RGG box*) e os sinais de localização e exportação nuclear (NSL e NES).

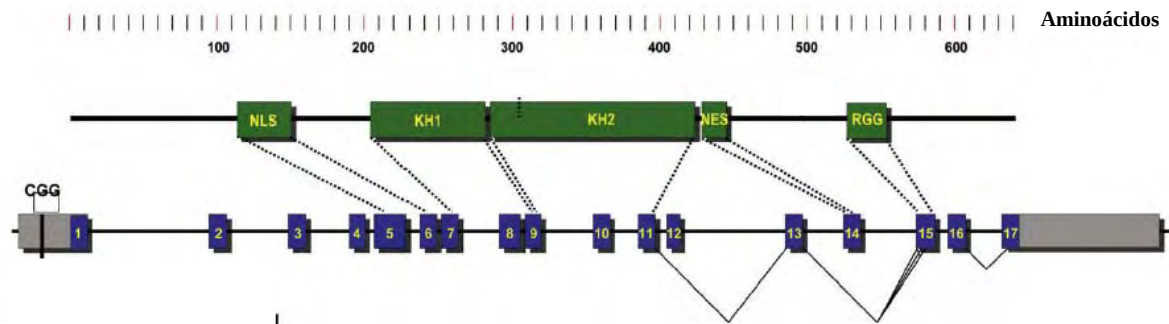


Figura 4. Representação do gene *FMR1* e da proteína FMRP. As caixas verdes indicam domínios da proteína (NLS – sinal de localização nuclear; KH1 e KH2 – domínios ligantes de RNA; NES – sinal de exportação nuclear; RGG – “box” RGG ligante de RNA. As caixas azuis indicam os 17 exons do gene. As caixas cinzas representam regiões não traduzidas. As linhas pontilhadas indicam os exons que codificam os domínios da proteína. As linhas contínuas indicam os processamentos alternativos do gene. (Modificada de Bassel; Warren, 2008).

A proteína FMRP apresenta, ainda, dois principais sítios CC (*coiled coil*) envolvidos na interação com outras proteínas, como por exemplo: FXR1P (*Fragile X Related Protein 1*), FXR2P (*Fragile X Related Protein 2*), CYFIP1 (*Citoplasmic FMR1 Interacting Protein 1*), CYFIP2 (*Citoplasmic FMR1 Interacting Protein 2*) e NUFIP1 (*Nuclear FMRP interacting protein*) (D’HULST; KODY, 2009). Na figura 5 é possível visualizar na proteína FMRP os sítios (CC) de interação com outras proteínas e alguns exemplos de proteínas que interagem com a FMRP.

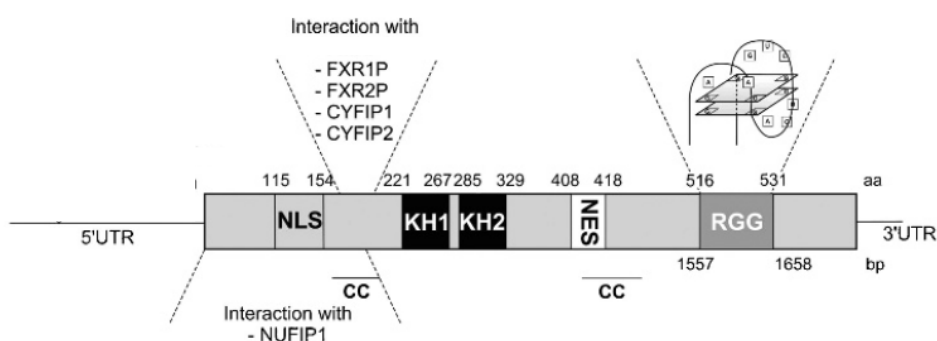


Figura 5. Representação esquemática do mRNA do gene *FMR1* e da proteína FMRP. Os sítios (CC) de interação com proteínas e as proteínas que interagem com a FMRP são visualizados. (Modificada de D'Hulst; Kody, 2009).

A proteína FMRP é altamente conservada em vertebrados e amplamente expressa. Observa-se particular expressão em ovário, timo, olhos, epitélio esofágico e do baço, com abundante expressão no cérebro e testículos. Já, uma moderada expressão de FMRP foi demonstrada no colo do útero, tireóide e fígado (D'HULST; KODY, 2009). No cérebro, a expressão de FMRP é restrita à diferenciação de neurônios e é ausente em células nervosas não neuronais (DEVYS et al., 1993).

Tamanini et al. (1997) encontraram, em células germinativas primordiais de fetos e adultos normais, alta expressão da proteína FMRP. A proteína também foi encontrada em testículos de fetos e adultos portadores do alelo FM do gene *FMR1*. Nos adultos a expressão da proteína era normal. Isso coincide com relatos anteriores onde pacientes com FM nas células somáticas apresentavam alelo PM nas células germinativas (REYNIERS et al., 1993; DE GRAAF et al., 1995).

2.3.2 *FMRP: RNAs alvos e interação com proteína*

A pesquisa por RNAs que se ligam à proteína FMRP resultou na identificação de uma grande quantidade de mRNAs responsáveis pela síntese de diferentes proteínas com variadas funções (D'HULST; KODY, 2009). Myashiro et al. (2003) identificaram mais de 80 mRNAs, dos quais 60% estão envolvidos diretamente com a FMRP. Realizando experimentos com ratos, esses autores observaram que muitos desses mRNAs (e suas proteínas correspondentes) demonstravam mudanças sutis de localização e abundância da proteína FMRP. Os dados foram consistentes com a ideia de que a FMRP regula seletivamente múltiplos caminhos biológicos.

Uma grande quantidade de proteínas podem interagir direta ou indiretamente com a FMRP (D'HULST; KODY, 2009). Muitas dessas proteínas, como FXR1P, FXR2P, NUFIP1, entre outras, podem modular a afinidade de FMRP para diferentes classes de mRNAs, induzindo mudanças estruturais na conformação da proteína. Isso gera domínios de RNAs diferentes, possibilitando a ligação de outros mRNAs (D'HULST; KODY, 2009).

2.3.3 *Algumas funções descritas da FMRP.*

Diante da vasta gama de mRNAs e proteínas que podem ligar-se à proteína FMRP, as funções dessa proteína podem ser inúmeras. A proteína FMRP tem importante papel na regulação e tradução de específicos alvos mRNAs (OOSTRA et al., 2009). Jin e Warren, (2003) propuseram um modelo para comprovar que a FMRP tem um importante papel na plasticidade das sinapses dos neurônios através do transporte e regulação da síntese proteica de específicos mRNAs em resposta à estimulação sináptica. Também já foi descrito, em trabalhos *in vitro* que a proteína FMRP pode atuar como repressor da tradução de seu próprio mRNA (LAGGERBAUER et al., 2001).

Nos neurônios, a FMRP está localizada dentro e na base dos espinhos de dendritos (D'HULST; KODY, 2009). Os espinhos de dendritos são pequenas extensões de membrana plasmática em um dendrito de neurônios, no cérebro. Esses espinhos servem como sítios de armazenamento sináptico, suporte de transmissão de sinal elétrico, e aumento do número da possibilidade de contato entre neurônios. Muitos estudos apresentam anormalidades na formação dos espinhos de dendritos em SXF, que podem estar diretamente relacionadas com prejuízo cognitivo (CHONCHAIYA et al., 2009). Assim, os baixos níveis de FMRP afetam o desenvolvimento dos neurônios, levando a problemas que envolvem as funções cognitivas de motivação, leitura e memória (CHONCHAIYA et al., 2009).

2.4 **Correlação genótipo-fenótipo**

A SXF manifesta características clínicas diferentes para o gênero masculino e feminino. A variação nos distúrbios ocorre de acordo com as características genéticas individuais e influência ambiental. Além disso, há as variações no gene *FMR1*, como diferentes graus de mosaicismos, níveis de mRNAs do gene *FMR1*, níveis da proteína FMRP e a proporção de alelos NL do gene *FMR1*, ativos em mulheres (CHONCHAIYA et al., 2009).

Dependendo do tamanho da expansão de repetições CGG ocorre menor ou maior bloqueio à tradução da proteína FMRP. Alelos FM são geralmente hipermetilados e silenciados, o que leva à pouca ou nenhuma produção de mRNA ou proteína. O tamanho da expansão de repetições CGG no alelo PM leva à toxicidade gerada pelo excesso de mRNA. Essa toxicidade e a redução na expressão da proteína FMRP podem ambos contribuir com os distúrbios clínicos (HAGERMAN; HAGERMAN, 2008).

As características clínicas abrangem distúrbios médicos e psiquiátricos em indivíduos com alelos PM e FM. Esses distúrbios podem ser divididos em cognitivos, comportamentais, psicológicos e morfológicos (CHONCHAIYA et al., 2009). É importante ressaltar que o autismo (doença heterogênea de forte influência genética - RODRIGUEIRO, 2006), tem relação íntima com a SXF, e algumas características clínicas são mais severas em indivíduos que tem a SXF associada ao autismo, do que em indivíduos que manifestam somente a SXF (ROGERS et al., 2001; KAUFMANN et al., 2004; HALTON et al., 2006; ROBERTS et al., 2007).

2.4.1 *Fenótipos cognitivos em indivíduos com alelo FM da SXF*

A principal característica da SXF é a deficiência mental. Essa deficiência manifestada apresenta-se de leve a grave, com valores QI (*Intelligence Quotient*) entre 20 e 60 (SOFOCLEUS et al., 2009). Cerca de 85% de homens e 25 - 30% de mulheres com a FM do gene *FMR1* tem índices de QI menores de 70 (LOESCH et al., 2004). A severidade da deficiência mental está relacionada à deficiência da proteína FMRP (LOESCH et al., 2004). Indivíduos com discretas diminuições nos níveis de FMRP podem apresentar QI normal (ou próximo do normal) com ou sem dificuldades de aprendizagem. Esses indivíduos são, em geral, mulheres com a SXF (CHONCHAIYA et al., 2009). A trajetória de desenvolvimento cognitivo na SXF é lenta e podem ser observados declínios de QI no final da infância e adolescência. A capacidade cognitiva continua a aumentar, embora a taxas mais lentas do que o normal (SKINNER et al., 2005).

Aproximadamente 30% dos meninos com SXF tem comportamento autista (LEWIS et al., 2006). Em crianças portadoras da SXF com idade de 1 a 6 anos, foram descritas alterações no sistema motor, principalmente, quando há associação dessa SXF com o autismo (ZINGEREVICH et al., 2009). Adicionalmente, competências cognitivas, de linguagem e adaptativas são mais baixas em pacientes com a SXF associada ao autismo (ROGERS et al., 2001; KAUFFMANN et al., 2004; LEWIS et al., 2006).

Prejuízos cognitivos envolvem funções executivas, memória visual, coordenação motora visual, memória auditiva de curto prazo, processamento de informações sequenciais, atenção continuada e memória de trabalho (ROBERTS et al., 2005; REISS et al 2007; FARZIN et al., 2008; CORNISH et al., 2008). Aproximadamente 30% a 50% de todas as mulheres com a FM tem índices de QI normais. Porém, é possível observar dificuldades de leitura, função executiva deficiente, distúrbios de atenção, dificuldades com a matemática e deficiências de linguagem ou aprendizagem. A proteína FMRP regula a síntese de proteínas participantes das sinapses de neurônios. A ausência da proteína FMRP ocasiona alta expressão de proteínas, principalmente, da via mGluR5 (*Metabotropic Glutamate Receptor 5 Pathway*) levando, à depressões nas sinapses à longo prazo ou o enfraquecimento das ligações sinápticas (BEAR et al., 2004). Estudos com modelos animais revelaram que os déficits cognitivos estão relacionados à alta expressão de proteínas da via mGluR5 (DE VRIJ et al., 2008; DOLEN et al., 2008).

Casos de epilepsia ocorrem em aproximadamente 10-40% de indivíduos com SXF (MUSUMECI et al., 1999; BERRY-KRAVIS et al., 2002). As crises são generalizadas ou parcialmente complexas e podem ocorrer à noite (BERRY-BRAVIS et al., 2002). Tais crises são 3 vezes mais comuns em indivíduos com SXF associada ao autismo se comparada com a SXF sem autismo (GARCIA-NONELL et al., 2008). Estudos com modelos animais tem demonstrado que alta expressão de proteínas na via do receptor mGluR5 leva à fenótipos de crise epiléptica (YAN et al 2005).

As dificuldades de linguagem variam de total ausência de linguagem até dificuldades medianas na comunicação (RODRIGUEIRO, 2006). Tem sido observado um padrão de fala desordenado, onde a fala é rápida, ocasionalmente confusa, repetitiva e desorganizada (PLOMIN et al., 2001).

2.4.2 *Fenótipos comportamentais e psicológicos em indivíduos com alelos FM da SXF*

As características comportamentais e psicológicas na SXF, incluem: timidez, esquivas social, ansiedade, distração, hiperatividade, desatenção, impulsividade, defensividade tátil, comportamento de auto-lesão, instabilidade agressiva, irritabilidade, inflexibilidade e comportamentos autista (contato visual pobre, ecolalia, palilia, comportamentos motores repetitivos ou estereotipados [ex. agitar e morder as mãos] e hipersensibilidade sensorial) (HAGERMAN in HAGERMAN; HAGERMAN, 2002; KAUFMANN et al., 2004; BUDIMIROVIC et al., 2006; BAILEY et al., 2008).

A identificação precoce da SXF na infância (entre 9 e 12 meses) pode ser facilitada pela presença incomum de desenvolvimento sensor e motor (ex. desempenhar competências objetivas, como movimentos giratórios) e padrões motores (ex. movimentos repetitivos de pernas e postura incomum) (CHONCHAIYA et al., 2009).

Em mulheres, tipicamente, os comportamentos e os problemas cognitivos são mais leves do que os observados em homens. Isso pode ser explicado por haver alguma produção da proteína FMRP a partir do alelo normal do gene *FMR1*, presente no outro cromossomo X (CHONCHAIYA et al., 2009). Não obstante, as mulheres são susceptíveis ao desenvolvimento de problemas emocionais, tais como: depressão, ansiedade social e afastamento (REISS et al., 2007).

Indivíduos com SXF possuem distúrbios no sistema nervoso autônomo. Esses distúrbios são mais comuns em pacientes com SXF associada ao autismo (ROBERTS et al., 2006). As crianças são mais susceptíveis a ter ansiedade. A razão dessa susceptibilidade pode estar na resposta simpática (relacionada ao sistema nervoso simpático) aos estímulos do meio, e a capacidade de se acostumar com esses estímulos (CHONCHAIYA et al., 2009). Essa desregulação autônoma está provavelmente relacionada à alta expressão de proteínas na via do receptor mGluR5 e a baixa expressão de proteínas do sistema do neurotransmissor GABA (*Gamma-aminobutyric acid*) (HESSL et al., 2002). Indivíduos com SXF também possuem maior liberação de cortisol após um estímulo estressante (HESSL et al., 2002). A alta liberação de cortisol pode levar à ADHD (Déficit de Atenção e Transtorno de Hiperatividade) que requer tratamento médico (HAGERMAN et al., 2009).

2.4.3 Fenótipos físicos em indivíduos com FM

Os indivíduos portadores da SXF manifestam uma ampla variedade de características físicas. Entretanto, nenhuma dessas características é específica da síndrome, e nenhuma das características é encontrada em 100% dos afetados (RODRIGUEIRO, 2006).

Muitos portadores da SXF jovens e do sexo masculino tem alterações no tecido conjuntivo, demonstrando problemas nas fibras elásticas da pele, na aorta e nas válvulas do coração (HAGERMAN; HAGERMAN, 2002). As alterações nas fibras elásticas da pele incluem: orelhas proeminentes, hiperextensibilidade das articulações dos dedos, pele macia e pés chatos. Outras características identificadas são: *pectus excavatum*, prolapso da válvula mitral, estrabismo, macroorquidismo, mandíbula proeminente e face alongada (HAGERMAN; HAGERMAN, 2002). A face alongada ocorre por hipoplasia mandibular (RODRIGUEIRO, 2006). O macroorquidismo usualmente começa a aparecer aos 8 anos de

idade e o tamanho máximo que os testículos podem atingir (em torno de 2 ou 3 vezes o tamanho normal) é observado na adolescência (LACHIEWICZ et al., 1994). Todas estas manifestações clínicas poderiam ser explicadas pela alteração do tecido conjuntivo, uma vez que neste tecido há alta expressão do gene *FMR1*.

Mulheres portadoras da FM que apresentam deficiência mental manifestam, ocasionalmente, algumas características faciais exibidas por homens afetados. Porém, na maioria dos casos, as características físicas são normais (HAGERMAN; HAGERMAN, 2002).

2.4.4 *Relação das características entre indivíduos portadores de FM e autismo*

O autismo é uma desordem com forte influência genética que é definida, segundo o critério DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*), como um grave comprometimento da interação social ou verbal e de habilidades de comunicação não verbal aliado a um repertório restrito de atividades e interesses (APA, 2000).

A prevalência de autismo em indivíduos com a SXF foi relatada como sendo de 15 a 35%, embora a ADOS (*Autism Diagnosis Observation Schedule*) considere aproximadamente 30% (ROGERS et al., 2001; KAUFMANN et al., 2004; HARRIS et al., 2008). Essa prevalência provavelmente é devido ao fato da proteína FMRP regular a tradução de muitas proteínas associadas ao autismo, como SHANK, PTEN, CYFIP, PSD95 (BEAR et al., 2004; BELMONTE et al., 2006; BASSEL; WARREN, 2008).

Indivíduos com SXF associada ao autismo, quando comparados com indivíduos que somente possuem a SXF, são mais severamente comprometidos em relação à aspectos cognitivos, comportamentos adaptativos, linguagem e interação social (ROGERS et al., 2001; KAUFMANN et al., 2004; KAU et al., 2004; ROBERTS et al., 2007; HALTON et al. 2006). Os déficits de linguagem em indivíduos com a SXF e autismo envolvem severos déficits receptivos, incluindo aspectos de raciocínio verbal, além do reconhecimento e diferenciação de emoções (LEWIS et al., 2006; BUDIMIROVIC et al., 2006). O prejuízo social afetivo em crianças com SXF e autismo torna difícil o aprendizado da língua de forma efetiva (CHONCHAIYA et al., 2009). O diagnóstico de autismo em crianças com SXF inclui a avaliação de déficits de comunicação, comportamento de afastamento social, deficiências no complexo de interações sociais e competências de adaptação social, já que essas características estão altamente associadas ao autismo (KAUFMANN et al., 2004; KAU et al., 2004; BUDIMIROVIC et al., 2006). Altos níveis de afastamento social, considerados muito

evasivos em vários contextos e baixos em outros, podem ser vistos em indivíduos com a SXF associada ao autismo (ROBERTS et al., 2007). Comportamentos autistas na SXF e de reação emocional do paciente podem variar diariamente ou mesmo em determinados horários do dia (CHONCHAIYA et al., 2009). Nota-se que uma avaliação abrangente envolvendo diferentes especialidades da Medicina pode ser necessária para chegar a um consenso sobre o diagnóstico do autismo. Tal diagnóstico é essencial para ajudar as crianças a receberem intervenções adequadas para o autismo, embora tais intervenções também possam beneficiar indivíduos que tenham somente a SXF (HARRIS et al., 2008).

2.4.5 Fenótipos em indivíduos com PM.

Indivíduos portadores de alelo PM da SXF podem apresentar ou não fenótipos clínicos (CHONCHAIYA et al., 2009). Dentre os distúrbios observados destaca-se o risco aumentado de desordens de humor e de ansiedade. Além disso, os homens podem ter particular aumento no risco de desordens caracterizadas por afastamento social (transtorno de personalidade e fobia social) (BOUGEOIS et al., 2009). Apesar de muitos indivíduos não sofrerem com problemas cognitivos, psiquiátricos ou médicos, mulheres com o alelo PM podem apresentar falha prematura dos ovários (POF (*Primary Ovarian Failure*) ou POI (*Primary Ovarian Insufficiency*)) e/ou síndrome Tremor-ataxia (FXTAS (*Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome*)) (WITTENBERG et al., 2007; HAGERMAN et al., 2004).

Em indivíduos com o alelo PM os níveis de mRNAs do gene *FMR1* estão aumentados. Muitos problemas observados em indivíduos com PM estão relacionados ao ganho de função secundária de RNA obtido pela elevada quantidade de mRNAs presentes (CHONCHAIYA et al., 2009). Os elevados níveis de mRNAs levam à toxicidade celular, principalmente em neurônios (HAGERMAN et al., 2004; HAGERMAN; HAGERMAN, 2008), já que causam desregulação de muitas proteínas (CHONCHAIYA et al 2009).

Mulheres portadoras de PM que geralmente apresentam um quociente QI normal manifestam um risco aumentado para POF (WITTENBERGE et al., 2007), depressão e ansiedade, (HESSL et al., 2005), hipotireoidismo, fibromialgia, neuropatia e FXTAS (COFFEY et al., 2008). Homens podem desenvolver problemas que incluem: perda da memória de curto prazo, parkinsonismo, neuropatia periférica, ansiedade, comportamento reclusivo, demência, fraqueza muscular, disfunção do sistema nervoso autônomo (JACQUEMONT et al., 2003), déficits de atenção e de função executiva, hiperatividade, problemas de memória e desordens relacionadas ao autismo (AZIZ et al., 2003; FARZIN et al., 2006). Problemas psicopatológicos mais comuns (ansiedade, depressão e comportamento

obsessivo compulsivo) são clinicamente significantes em 25 a 40% dos pacientes (CHONCHAIYA et al., 2009).

A POF é definida como menopausa ou amenorréia hipoestrogênica que ocorre antes dos 40 anos (HAGERMAN; HAGERMAN, 2002). Estimativa desse problema nas mulheres com PM são da ordem de 4% aos 30 anos e 25% aos 39 anos de idade (HUNDSCHIED et al., 2000).

A FXTAS é uma desordem degenerativa que ocorre predominantemente em homens de 50 a 70 anos com PM (HAGERMAN; HAGERMAN, 2004), embora aproximadamente 8% das mulheres com PM são afetadas (COFFEY et al., 2008). As características dessa desordem incluem: intenso tremor, ataxia, parkinsonismo, neuropatias, déficits cognitivos e de funções executivas, eventual declínio à demência e disfunções autônomas como hipertensão, impotência, e eventuais incontinências urinária e intestinal (JACQUEMONT et al., 2003; BERRY-KRAVIS et al., 2007; COFFEY et al., 2008).

2.4.6 *Fenótipos em indivíduos com GZ.*

Pacientes GZ podem apresentar algumas deficiências como dificuldades de aprendizado e distúrbio comportamental (MITCHELL et al., 2004). Em um estudo na Tasmânia, com meninos que apresentavam necessidades especiais, Mitchell et al. (2004) relataram que 3,4% deles apresentaram alelos GZ. Vale ressaltar que Bretherick et al. (2005), realizando estudo em pacientes com POF, observaram que algumas pacientes possuíam alelos GZ.

2.5 **Prevalência populacional da SXF**

A prevalência da expansão das repetições CGG é similar na maioria dos grupos étnicos, mas podem ocorrer variações entre as populações (QUEIROZ, 2006). Há pouco consenso da prevalência dessa síndrome na população geral (principalmente quando se consideram variações geográficas) e entre os gêneros feminino e masculino (HAGERMAN, 2008).

Considerando o consenso internacional sobre o fato da SXF ser subdiagnosticada, a prevalência de 1:4000 (TURNER et al., 1996) foi amplamente utilizada até recentemente, quando HAGERMAN, 2008 em um amplo estudo sobre prevalência da SXF, sugere que seja considerada a prevalência de 1:2500 dessa síndrome tanto em homem como mulheres.

Um estudo em pacientes do Canadá revelou a prevalência do alelo PM em 1:259 mulheres (ROUSSEAU et al., 1995). Os mesmos pesquisadores (DOWBROWSKI et al.,

2002) realizaram um estudo em outros 10.572 homens e puderam observar uma prevalência de 1:813 do alelo PM. Toledano et al. (2001) analisaram 14.334 mulheres em fase pré-conceptiva ou gestacional, sem histórico familiar de retardo mental. Os resultados obtidos identificaram a presença de alelos com número de repetições CGG maior que 54 em 1:113 mulheres e de alelos com número de repetições CGG menor que 54 em 1:69 mulheres. Tais resultados ainda, proporcionaram aos autores evidenciar a alta prevalência de alelos PM na população em geral, recomendando a triagem de mulheres portadoras de PM em larga escala.

2.6 Diagnósticos laboratoriais da SXF

Como as características clínicas da SXF podem ser comuns a outros casos de atraso e distúrbios gerais de desenvolvimento, é necessária a confirmação da referida síndrome por uma avaliação laboratorial específica. O diagnóstico da SXF pode ser fornecido pela análise da presença e do número de repetições CGG expandidas e/ou pela presença ou ausência de metilação (QUEIROZ, 2006).

Muitas técnicas para identificação da SXF já foram relatadas na literatura: análise citogenética (LUBS, 1969), teste de identificação da proteína FMRP em células ou tecidos (WILLEMSSEN et al., 1995; WILLEMSSEN et al., 1997; WILLEMSSEN et al., 2002) e testes moleculares (ROUSSEAU et al., 1991; HADDAD et al., 1996; HEID et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007; TASSONE et al., 2008; DODDS et al., 2009; SAUL; TARLETON, 2010; FILIPOVIC-SADIC et al., 2010; CHEN et al., 2010).

O primeiro método descrito para diagnóstico da SXF foi a análise citogenética que consiste no estudo numérico e morfológico de cromossomos em metáfase (LUBS, 1969). Nessa análise, as culturas celulares são realizadas em meios modificados, geralmente com deficiência de ácido fólico, para induzir sítios frágeis (SAUL; TARLETON, 2010). Essa técnica demonstra insuficiente especificidade e sensibilidade (MADDALENA et al., 2001; SAUL; TARLETON, 2010), além disso, é muito mais cara que os testes moleculares (SAUL; TARLETON, 2010). Portanto, esse método não tem mais sido recomendado para o diagnóstico da SXF (MADDALENA et al., 2001).

O primeiro teste de identificação da proteína FMRP foi descrito por Willemsen et al. (1995). Esse teste informa o percentual de FMRP em linfócitos de amostras de sangue analisadas. Pacientes afetados possuem de 0-15% de FMRP, enquanto pessoas normais apresentam de 80-100%. O teste pode ser aplicado em células (imunocitoquímica) ou em

tecidos (imunohistoquímica) (WILLEMSSEN et al., 1995; WILLEMSSEN et al., 2002). Tais testes são limitados para detectar portadores de alelo FM (MADDALENA et al., 2001). Segundo Saul e Tarleton (2010), esse método não é realizado rotineiramente nos laboratórios provavelmente por requerer sangue fresco, o que confere uma limitação ao seu emprego.

Os testes moleculares para diagnóstico da SXF tem sido mais utilizados pelos laboratórios, pois apresentam resultados mais sensíveis e específicos. Os testes convencionais envolvem as técnicas de *Southern Blot* (ROUSSEAU et al., 1991) e *PCR* (*Polimerase Chain Reaction*) (HADDAD et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007; TASSONE et al., 2008; FILIPOVIC-SADIC et al., 2010; CHEN et al., 2010). Doods et al. (2009) apresentaram uma associação de *PCR* com a técnica de digestão nuclear e espectometria de massas afim de melhorar a obtenção de resultados. Além das técnicas convencionais, também podem ser realizadas técnicas como: *RT-PCR* (*Reverse Transcription PCR*) (HEID et al., 1996), análise por *FISH* (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (SAUL; TARLETON, 2010) e sequenciamento do DNA.

Por meio da *PCR* é possível amplificar a região do gene *FMR1* que flanqueia à repetição CGG para verificar se há a presença de alelos expandidos e qual o seu tamanho. Porém, a eficiência da reação da *PCR* diminui conforme aumenta o número de repetições (HAMDAN et al., 1997; SALUTO et al., 2005). No método *Southern blot*, o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição, os fragmentos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana, a qual é exposta à hibridização com uma sonda marcada (com radioisótopo ou fluorescência) para detectar a expansão CGG. Dessa forma, determinam-se o tamanho dos alelos e a identificação da metilação nos mesmos (ROUSSEAU et al., 1991). Entretanto, como o *Southern blot* é um método de alto custo e trabalhoso, a maioria dos laboratórios realiza a *PCR* como método de triagem e o *Southern blot* somente em amostras que deixaram dúvida pela *PCR*, ou aquelas em que é necessário verificar o estado de metilação do alelo (SALUTO et al., 2005).

Algumas dificuldades metodológicas estão relacionadas ao emprego da *PCR* para a triagem de indivíduos com SXF. Como as repetições CGG são ricas em nucleotídeos Citosina e Guanina, há a tendência de se formarem estruturas secundárias (*hairpins*) reconhecidas pela DNA polimerase como sítios de pausa, resultando em amplificações incompletas e produtos da *PCR* com múltiplas bandas (QUEIROZ, 2006). Para diminuir tais estruturas secundárias pode-se utilizar na *PCR* o 7-deaza-2'- deoxiguanosina trifosfato e também o dimetilsulfóxido (DMSO). A utilização desses reagentes dificulta a visualização de bandas em gel de agarose.

Assim, como os produtos de *PCR* não são visíveis no gel de agarose, são utilizados desoxinucleotídeos marcados com ^{32}P , permitindo a visualização dos produtos da *PCR* por autoradiografia, porém somente após 1 a 4 dias de exposição (HAMDAM et al., 1997). Por outro lado, mesmo utilizando os reagentes mencionados acima, há a possibilidade de visualização dos produtos da *PCR* em gel de poliacrilamida (HADDAD et al., 1996).

Seja em gel de agarose ou de poliacrilamida, por meio da *PCR* convencional algumas amostras não fornecem um diagnóstico preciso. Por exemplo, amostras de mulheres que amplificam somente uma banda na faixa da normalidade podem na verdade ser heterozigotas e carregar um alelo FM (o qual, pelo seu longo tamanho de *amplicon*¹ acaba não sendo visualizado). O mesmo ocorre com amostras de homens que não produziram bandas, sugerindo que podem ter um alelo FM, cujo *amplicon* não foi detectável pelo método (HADDAD et al., 1996; QUEIROZ, 2006).

Em face dessas dificuldades, vários autores propuseram modificações no método da *PCR*, além de outras técnicas para o diagnóstico da SXF; por exemplo, detectar alelos metilados na região de expansão CGG no gene *FMR1*. A expansão das repetições CGG aumenta a chance de ocorrer metilação na região. Para essa detecção, costuma-se utilizar o DNA genômico tratado com bissulfito, para análise por *PCR* com *primers* específicos que detectam alelos metilados (*MS-PCR*, *Methylation Specific PCR*), além de proporcionar uma redução na dificuldade de amplificação da região por *PCR*. Essas técnicas para detectar metilação utilizam eletroforese em gel de agarose (PANAGOPOULOS et al., 1999), poliacrilamida (ROSALES-REYNOSO et al., 2007) e até *PCR* em tempo Real (DAHL et al., 2007). Porém, o problema para diagnosticar mulheres portadoras de um alelo FM persistiu, pois assim como nos métodos da *PCR* convencional, ocorre a amplificação preferencial do alelo NL em mulheres heterozigotas.

Algumas modificações no protocolo da *PCR* convencional incluíram a adição de betaina para reduzir as estruturas secundárias do DNA e utilização de tipos alternativos de DNA polimerase que são capazes de expandir cadeias longas com alta fidelidade, como uma combinação da DNA polimerase do tipo *Pfu* (*proofreading enzyme*) com a *Taq* DNA polimerase (HAMDAM et al., 1997), ou a enzima *Expand Long Template PCR System* (Roche) (SALUTO et al., 2005). Tais modificações facilitaram a visualização dos produtos da *PCR* com até 300 repetições CGG em pacientes do gênero masculino e 160 repetições em pacientes do gênero feminino, em gel de agarose (SALUTO et al., 2005). Mesmo assim

¹ Sequência de DNA produzida pela *PCR*

persistia a não distinção de mulheres heterozigotas com alelo FM (expansão > 200 repetições, cujo *amplicon* não é visualizado no gel), de homens afetados (com alelo FM) e de homens mosaico para SXF. Nesses casos a banda que caracteriza o alelo FM não é distinguível no gel (SALUTO et al., 2005).

Comparando o método da *PCR* com o *Southern blot*, não há dúvida de que a *PCR* mostra as vantagens de ser um método mais econômico, rápido, de maior biossegurança e que necessita de menos quantidade de DNA genômico para sua realização. Por esses motivos a *PCR* tem sido empregada como método de triagem da SXF. No entanto, a *PCR* não tem sido utilizada como método de diagnóstico da SXF devido à sua limitação em identificar com precisão casos como mulheres heterozigotas (ou homozigotas para a FM, evento raro) e homens mosaicos, pois nessas situações os indivíduos portam alelos com FM de mais de 300 repetições CGG de maneira que tal *amplicon* não pode ser visualizado no gel.

Métodos alternativos tem sido buscados para aumentar a eficiência da *PCR* para que possa ser empregado como método de diagnóstico da SXF. Tassone et al. (2008) descreveram um novo método da *PCR* de triagem da SXF. Nele, os autores introduzem modificações no método da *PCR* anteriormente descrito por Saluto et al. (2005), além de inovar com a possibilidade de distinguir (em gel de agarose) mulheres homozigotas para o alelo NL de mulheres heterozigotas que carregam o alelo FM ou PM muito longos, caracterizando uma grande vantagem. Além disso, também foi possível detectar visualmente a presença de alelos FM e PM em homens cujo produto de *PCR* não amplificava, podendo também identificar mosaicismo (TASSONE et al., 2008).

A metodologia desenvolvida por Tassone et al. (2008) é simples: para as amostras inconclusivas pelo método de Saluto et al. (2005), realiza-se uma segunda reação de *PCR* com um novo *primer* denominado quimérico. Na região 3' desse *primer* há uma repetição de 4 trinucleotídeos CCG que se anela ao acaso na região de repetições CGG do gene *FMR1*, de forma que produz um arraste no gel de agarose depois de corado por brometo de etídio. Esse arraste comprova a existência de um alelo mutado não distinguível em gel para mulheres que apresentavam somente uma banda e homens que não amplificavam nenhuma banda.

O método desenvolvido por Tassone et al. (2008) parece ser revolucionário, pois somente a *PCR* resolveria a maioria dos casos de suspeita de SXF (afetados ou portadores de alelos PM ou FM, de ambos os sexos, inclusive mosaicos). Assim, o *Southern Blot* seria empregado somente em casos onde não foi possível obter diagnóstico por *PCR* e naqueles em que seja importante saber se os alelos estão metilados. Além disso, o método de Tassone et al. (2008) parece ser rápido, de baixo custo e utiliza pouca quantidade de DNA. Os autores

demonstraram a aplicabilidade do método para rastreamento da SXF em recém-nascidos, utilizando manchas de sangue em papel absorvente especial. No entanto, observou-se a ausência de detalhes importantes na metodologia, como: a quantidade de enzima utilizada, a forma de realização do *hot start*, as adaptações realizadas para a aplicação do método com uma enzima alternativa. A ausência desses detalhes dificulta a reprodução da técnica. Observou-se também a ausência de ilustração do padrão de bandas obtidas no gel de agarose para indivíduos do sexo masculino portadores de alelos PM e FM, quando realizada a 2ª PCR

Recentemente, Chen et al. (2010) descreveram uma técnica de PCR que combina: (i) a utilização de reagentes que amplificam com alta eficiência regiões ricas em nucleotídeos GC (FILIPOVIC-SADIC et al., 2010) e (ii) o primer quimérico descrito por Tassone et al. (2008), com uma repetição CGG a mais. Segundo os autores, a técnica é capaz de detectar em gel de agarose até 1300 repetições CGG tanto em homens quanto em mulheres. Utilizando em seguida a eletroforese capilar, é possível obter os resultados com melhor precisão, e inclusive detectar repetições AGG. Assim essa técnica detectaria todos os alelos para a SXF, inclusive em casos de heterozigosidade. Devido a isso, o *Southern blot* seria aplicado somente em casos nos quais deseja-se saber o estado de metilação dos alelos.

2.6.1 Indivíduos que devem ser testados para a SXF

Segundo Hagerman e Hagerman, 2008, é altamente aconselhável a realização de testes moleculares no gene *FMR1* em alguns grupos de pacientes: (i) crianças com deficiências intelectuais e de desenvolvimento, além de comportamento autista; (ii) mulheres adultas com características de menopausa precoce e outros adultos com ataxia ou tremor intenso; (iii) e indivíduos com deficiências cognitivas ou demência, neuropatias, parkinsonismo, esclerose múltipla atípica, e distúrbios de ansiedade, principalmente se há histórico familiar de distúrbios intelectuais e do desenvolvimento, além de comportamento autista.

2.6.2 Aconselhamento genético e tratamento da SXF

Os testes diagnósticos para a SXF são importantes para correlacionar os distúrbios com a presença de ambos alelos PM e FM. O conhecimento da herança genética é importante para facilitar a intervenção precoce nos transtornos (HAGERMAN; HAGERMAN, 2008). As intervenções incluem: aconselhamento genético para toda a família; intervenções comportamentais e médicas diretas para crianças com deficiências de desenvolvimento; novas

opções de reprodução para mulheres que estão com o risco de desenvolver POF (ou POI); tratamento para adultos com PM que apresentam sinais de FXTAS; e tratamento precoce de depressão ou ansiedade (HAGERMAN, 2008; HAGERMAN et al., 2009). Testes de triagem em recém nascidos facilitam a intervenção precoce em crianças e o aconselhamento genético da família, além da identificação precoce e tratamento de outros membros da família (HAGERMAN; HAGERMAN, 2008).

No aconselhamento genético, o profissional responsável revisará os padrões genéticos da SXF permitindo a identificação de indivíduos com risco de portarem alelos PM e FM. (MCCONKIE-ROSELL et al., 1995). O profissional também pode aconselhar sobre opções reprodutivas para futuras gerações, incluindo doação de óvulos, diagnóstico pré-natal, adoção, e diagnóstico genético pré-implantação (GANE; CRONISTER in HAGERMAN; HAGERMAN, 2002; CEDERBAUM, 2007; McCONKIE-ROSELL et al., 2007).

Existem vários medicamentos que ajudam no tratamento de vários sintomas da SXF, principalmente em crianças (CHONCHAIYA et al., 2009). O uso de tratamentos direcionados é uma área interessante de investigação que promete reverter a epilepsia, problemas de comportamento e deficiências cognitivas (CHONCHAIYA et al., 2009). Bear et al. (2005), utilizando modelos animais, demonstraram que a inibição do receptor metabotrófico glutamato 5 (mGlu5) com antagonistas, normaliza parcialmente a depressão a longo prazo.

2.7 Justificativa e relevância do projeto

Conforme o exposto, o teste de diagnóstico da SXF deveria ser aplicado em um grande grupo de indivíduos e a descoberta precoce da síndrome é muito importante para o aconselhamento genético e eventuais intervenções de tratamento. Assim, faz-se necessária a existência de procedimentos de diagnóstico mais rápido e de baixo custo. Dentre as técnicas alternativas ao *Southern blot* existentes (HADDAD et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007), a técnica desenvolvida por Tassone et al. (2008), abrange os dois gêneros (masculino e feminino) e as três formas alélicas possíveis (NL, PM, FM). Segundo os autores, a técnica é uma boa alternativa de triagem da SXF (TASSONE et al., 2008).

Apesar da ausência de informações metodológicas importantes para reproduzir a técnica de Tassone et al. (2008), o presente trabalho enfrentou esse desafio, buscando padronizar a referida técnica e comparar os resultados obtidos com os de *Southern blot* (padrão-ouro). Também investigou-se a aplicação da referida técnica utilizando DNA de material biológico

extraído de outras fontes como células da mucosa oral e a estimativa de custo e do tempo de execução do método no mercado nacional.

Se confirmada a eficiência desse novo método da *PCR* como alternativa ao *Southern blot*, e se confirmando seu baixo custo no mercado nacional, poderá ser sugerida a futura utilização deste para triagem da SXF em indivíduos com suspeita clínica, como alunos que freqüentam escolas especiais, mulheres com falha prematura de ovário e homens com diagnóstico diferencial de outras ataxias, como FXTAS ou sintomas clínicos de portador de pré-mutação do gene *FMR1*.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Reproduzir a técnica proposta por Tassone et al. (2008) para triagem da Síndrome de X Frágil, realizando a padronização necessária para isso, em vista da não descrição pelos autores de detalhes metodológicos importantes.
- Procurar comprovar em pacientes brasileiros, a exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade da técnica adaptada de Tassone et al. (2008), com o método padrão-ouro de diagnóstico da SXF, o *Southern blot*.

3.1 Objetivos secundários

- Avaliar a aplicação da técnica adaptada de Tassone et al. (2008) utilizando DNA extraído de diferentes materiais biológicos.
- Estimar o custo do método no mercado nacional e o número de horas necessário para a sua execução.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

A casuística consistiu de 78 amostras de DNA. Dessas, 62 amostras foram cedidas por colaboração da Profa. Dra. Débora Aparecida Rodrigues da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS/PUC-SP) juntamente com a Profa. Dra. Ângela Maria Vianna-Morgante do Instituto de Biociências de São Paulo - USP. Outras 16 amostras foram coletadas de pacientes encaminhados pelo Prof. Dr. Valter Curi Rodrigues, pediatra com larga experiência em casos de dismorfologias clínicas do Centro Universitário de Araraquara (UNIARA). Após obter o consentimento livre e esclarecido dos voluntários, foram coletadas gotas de sangue periférico em um cartão *FTA (Whatman)*, onde o DNA fica aderido após purificação com o reagente *FTA (Whatman)*. Esse material biológico foi utilizado para realização da técnica adaptada de Tassone et al. (2008). Além disso, cerca de 15 µg de DNA de cada paciente, obtidos de célula da mucosa oral, foram encaminhados para um laboratório particular para realização do *Southern Blot*. Esse estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara (CEP/FCFAR nº 24/2008).

Visando ampliar as possibilidades de obtenção de DNA para realização do método de triagem da SXF, diferentes materiais biológicos foram utilizados. Isso se justifica pela probabilidade de pacientes se recusarem a doar sangue para realização do teste, já que há a utilização de agulhas. Na doação de células da mucosa oral, por exemplo, tal inconveniente não existe.

4.2 Obtenção do DNA

4.2.1 Cartão *FTA (Whatman)*

Essa metodologia buscou acompanhar o protocolo descrito por Tassone et al. (2008). Foram coletadas no cartão *FTA (Whatman)* gotas de sangue periférico de cada paciente por meio da perfuração do dedo, utilizando uma lanceta descartável. Os cartões foram mantidos à temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, o sangue foi purificado utilizando-se o Reagente de purificação *FTA (Whatman)*. Segue-se o protocolo de purificação para cada paciente recomendado pelo fabricante:

- Um círculo de 1.5 mm foi removido do cartão, com o auxílio do *Harris Uni-Core cutting mat – 1.5 mm (Whatman)*. O círculo foi transferido para um microtubo de 0.2 mL.
- Foi adicionado 200 µL do reagente de purificação e, após 5 min à temperatura ambiente o reagente foi removido com micropipeta. Este passo foi repetido mais duas vezes.
- Adicionou-se 200 µL de tampão T.E (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA – pH 8,0) e incubou-se por 5 min, removendo o tampão em seguida com micropipeta. Repetiu-se esse passo.
- Manteve-se o círculo de papel *FTA* em estufa à 37°C por 1 hora para secagem. Dessa maneira o material pôde ser armazenado em temperatura ambiente até o momento da realização da PCR.

4.2.2 *Sangue coletado pelo sistema à vácuo e DNA extraído com solventes orgânicos*

O sangue foi recolhido em tubos próprios (Vacuette) que continham EDTA como anticoagulante. O sangue foi transferido para tubos falcon de 15 mL, onde foi “lavado” várias vezes (até que o *pellet* de células ficasse branco) com solução de lise (10 mM Tris –HCl, 5mM MgCl₂, 10mM NaCl – pH 7,5) para remoção das hemácias. Em seguida foi realizada a extração do DNA.

O *pellet* de células foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Foi adicionado 500 µL de solução tampão (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, SDS 0,5%) e 2,5 µL de proteinase K (*USB*). Os microtubos foram incubados à 56°C por 2 horas. Após, foram adicionados 600 µL da mistura Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), agitou-se manualmente por 2 minutos e centrifugou-se por 3 min a 14.000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo e repetiu-se esse passo. Ao sobrenadante em um novo microtubo adicionou-se 600 µL de clorofórmio. Agitou-se manualmente por 2 minutos e centrifuga-se por 3 min a 14.000 rpm. Estimou-se o volume do sobrenadante coletado, que continha o DNA, e precipitou-se o mesmo com acetato de sódio (3M, pH 5,2; sendo 1/10 do volume do sobrenadante) e o dobro do volume de etanol absoluto. Os microtubos foram mantidos à –20°C por 12 horas. Em seguida foi realizada uma lavagem com 400 µL de etanol 70%. O etanol foi removido e o DNA mantido à temperatura ambiente para secagem. Foi adicionado 100 µL de água livre de DNases e RNases (*Ambion*). O DNA foi mantido à temperatura ambiente por 2 horas para

que ressuspendesse, quando, então, foi realizada a leitura da sua concentração e pureza, em um espectrofotômetro (*Biophotometer*, Eppendorf).

4.2.3 Células da mucosa oral e DNA extraído com solventes orgânicos

Foram coletadas células da mucosa oral por meio de bochecho com solução de glicose a 3%. O bochecho foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 min. Após essa centrifugação o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL de solução tampão (1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, SDS 0,5%) e 2,5 µL de proteinase K (*USB*). Após 2 horas a 56 °C, realizou-se a extração do DNA com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), sua precipitação com acetato de sódio e etanol, secagem e leitura da concentração do DNA, conforme citado no subitem anterior.

4.3 PCR para diagnóstico de alelos NL, PM e FM (1ª PCR)

Para amplificar as repetições CGG referentes a alelos normal, pré-mutado e mutado do gene *FMR1* foram utilizados os *primers* “c” e “f” descritos por Fu et al., (1991) e utilizados por Saluto et al., (2005) e Tassone et al., (2008):

Primer Forward (c) - 5' GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT 3'

Primer Reverse (f) - 5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CC A 3'

A Reação de *PCR* foi padronizada num volume final de 30 µL contendo: 1,5 mm do cartão *FTA* contendo o DNA aderido ou 100 à 900 ng de DNA extraído com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), Tampão 2 do kit *Expand Long Template PCR System* (*Roche Diagnostics*) contendo 2,25 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, 0,33 µM de cada *primer* e 2,2 M de Betaina (*USB*) e 0,5 U da enzima *Expand Long Template PCR System* (*Roche Diagnostics*).

Foram realizadas *PCRs* com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 98°C por 10 min.; 68°C por 2 minutos (*hot start*); seguida por 10 ciclos de 97°C por 35 s, 64°C por 35 s e 68°C por 4 min.; 25 ciclos de 97°C por 35 s, 64°C por 35s e 68°C por 4 min. (com 20 segundos de incremento em cada ciclo); e uma extensão final a 68°C por 10 min.

Também realizou-se a padronização com a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (*Roche Diagnostic*) que, segundo Tassone et al. (2008), elimina a necessidade de *hot start*,

porém os autores não descreveram detalhes metodológicos do uso dessa enzima. Após várias tentativas de padronização com essa enzima alternativa, decidiu-se realizar as reações da *PCR* com volume final de 30 μ L contendo: 1,5 mm do cartão *FTA* contendo o DNA aderido ou 100 a 900 ng de DNA extraído com Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1), tampão sem $MgCl_2$ do kit *FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostic)*; 2,25 mM de $MgCl_2$, 500 μ M de dNTPs, 0,33 μ M de cada *primer* e 2,2 M de Betaina (USB) e 0,5 U da enzima *FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostic)*. As condições de ciclagem foram as mesmas anteriormente citadas, com exclusão do passo de *hot start* (68°C por 2 minutos) e alteração na temperatura da enzima (de 68°C para 72°C).

A cada realização da *PCR* foram adicionadas duas reações: uma de controle negativo e outra chamada “branco”. Na reação de controle negativo foi usado o DNA de um indivíduo do sexo feminino com alelos NL para a SXF, para que fosse possível avaliar o funcionamento da *PCR* e comparar os resultados obtidos com um resultado normal. Na reação “branco” foram colocados os reagentes da *PCR*, sem o DNA. A utilidade da reação “branco” foi avaliar se houve alguma contaminação de reagentes na elaboração da *PCR*. As concentrações de reagentes utilizadas para as reações de controle negativo e do “branco” foram as mesmas utilizadas nas outras reações da *PCR*.

Após a *PCR* as amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em géis de agarose (2%) contendo Brometo de Etídio a 60 V por 60 min. Ao final da eletroforese as bandas foram visualizadas com o auxílio de um transiluminador (UVP, USA) Os géis foram fotografados com o fotodocumentador *GDS-8000 System* (UVP, USA).

As amostras visualizadas apresentam, em caso de normalidade bandas numa faixa de aproximadamente 239 a 383 pares de bases (pb) (incluindo de 6 a 54 repetições CGG, que é neste estudo é considerado normal). Em caso de indivíduos pré-mutados (ambos os gêneros) as bandas apresentam um tamanho de aproximadamente de 386 a 600 pb (incluindo de 55 a 200 repetições CGG, que é considerado alelo pré-mutado). Indivíduos que portam o alelo completamente mutado apresentam bandas com tamanho maior que 600 pb.

4.4 PCR para diagnóstico conclusivo de mulheres que apresentam uma única banda na faixa da normalidade e homens com ausência do produto amplificado (2ª PCR).

Foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando um *primer* quimérico conforme Tassone et. al., (2008) juntamente com o *primer* “c” (FU et. al., 1991) anteriormente citado.

Primer quimérico: 5'AGC GTC TAC TGT GTC GGC ACT TGC CCG CCG CCG CCG 3'

As concentrações de reagentes e condições de ciclagem permaneceram as mesmas do PCR inicial e os produtos da reação também foram visualizados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. Também houve a realização das reações de controle negativo e “branco”. A eletroforese ocorreu a 60V por 60 min. A presença de alelos expandidos (PM e FM) proporciona o anelamento ao acaso do *primer* quimérico na região das repetições CGG, produzindo no gel um arraste (*smear*) como indicado na Figura 6 (retirada de Tassone et al. 2008).

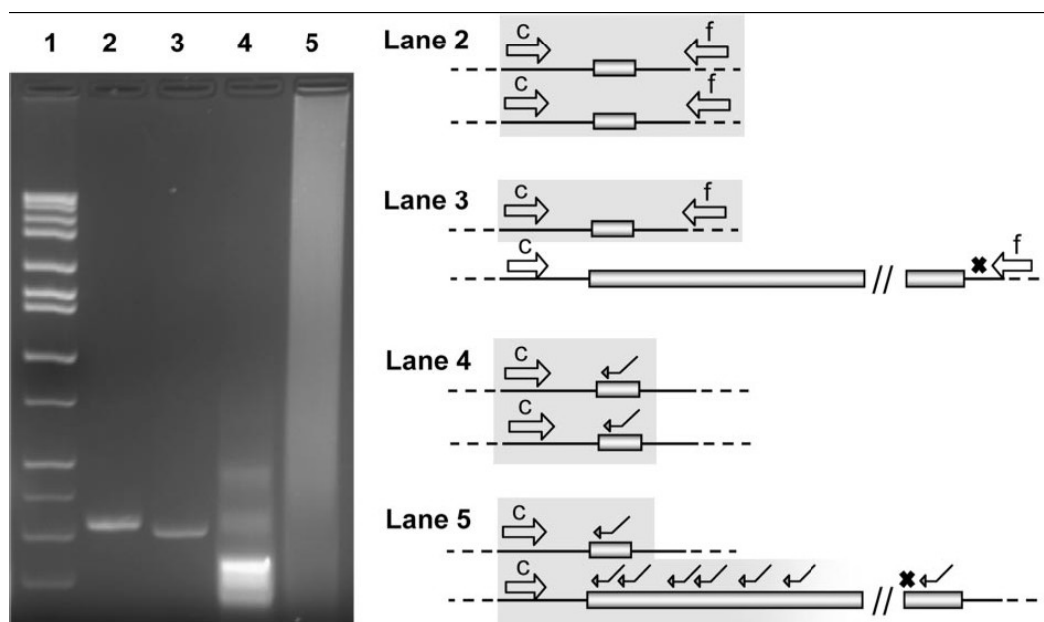


Figura 6. Esquema do método da 2ª PCR para resolver a aparente homozigose de mulheres. Esta abordagem utiliza uma combinação de betaina e um *primer* quimérico que anela ao acaso, mas com tamanho que permite a amplificação de pequenas expansões da repetição CGG. Para uma mulher normal (30,30 repetições de CGG) (**lane 2:** *primers* c e f de Fu et al., 1991; setas abertas), somente pequenos produtos de PCR são produzidos com o *primer* quimérico (**lane 4:** c setas abertas, e *primer* quimérico; setas dobradas). Entretanto, para uma mulher com mutação completa (28, 510, 615 repetições CGG) (**lane 3:** *primers* c e f, indicando ser aparentemente homozigota), um extenso “arraste” é produzido na segunda PCR pelo *primer* quimérico (**lane 5:** *primers* c e quimérico), indicando o anelamento com as regiões expandidas de repetições CGG. Para alelos com mutação completa, o anelamento do *primer* f com o DNA molde não ocorre. A representação dos produtos de PCR em cada lane é dado pela imagem do gel de agarose 2%.

4.5 Análise Estatística

Todos os pacientes para os quais foi aplicado o método adaptado de triagem da SXF por *PCR* (Tassone et al., 2008) tiveram também um resultado de diagnóstico por *Southern blot*. O *Southern blot*, considerado o método padrão-ouro para diagnóstico da SXF, foi realizado por laboratório terceirizado. Foi realizada uma comparação dos dois métodos para avaliar a exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade do método de Tassone et al. (2008).

A exatidão (acurácia) é a proporção das predições corretas, isto é, a soma de resultados positivos verdadeiros e de resultados negativos verdadeiros, dividida pelo total de casos (SABBATINI, 1995). A sensibilidade (S) é definida como a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença, quando esta é presente. A especificidade (E) é a proporção de negativos verdadeiros, ou seja, mede a capacidade do método em apontar ausência da condição nos casos que realmente esta não existe (SABBATINI, 1995). Em geral, a sensibilidade e a especificidade variam em direções opostas, ou seja, se o teste é muito sensível, este tende a gerar muitos resultados falso-positivos, diminuindo a especificidade. Quando o teste tem uma alta especificidade, ocorre o oposto: a sensibilidade cai devido ao grande número de resultados falso-negativos gerados. Consequentemente, é raro alcançar um método de decisão perfeito (100 % de sensibilidade e especificidade), sendo necessário atingir um balanço entre ambas medidas de desempenho (SABBATINI, 1995).

Na figura 7 representa-se a aplicação do teste de sensibilidade e especificidade.

		Doença		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
Teste	POS	a (verdadeiro positivo)	b (falso positivo)	a + b
	NEG	c (falso negativo)	d (verdadeiro negativo)	c + d
TOTAL		a + c	b + d	a + b + c + d

Sensibilidade (S) = $a / (a + c)$ Especificidade (E) = $d / (b + d)$ Acurácia (A) = $(a + d) / (a + b + c + d)$

Figura 7. Esquema do cálculo da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade.

A análise de especificidade e sensibilidade será realizada com o auxílio do programa BIOESTAT 5.0 (AYRES et al., 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise e escolha da melhor enzima para a realização do método

Tassone et al. (2008), descreve a utilização de dois tipos diferentes de enzima: a *Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostic)* e a *FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics)*. Após o encaminhamento dos primeiros pacientes pelo Dr. Valter Curi, realizaram-se as coletas de sangue periférico em cartão FTA e procedeu-se a purificação do DNA. Apesar da ausência de detalhes metodológicos, através de adaptações, foram realizadas as duas reações de *PCR*, utilizando-se a enzima *Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostic)*. Obteve-se um resultado condizente com o proposto por Tassone et al. (2008) para todas as amostras (Figura 8).

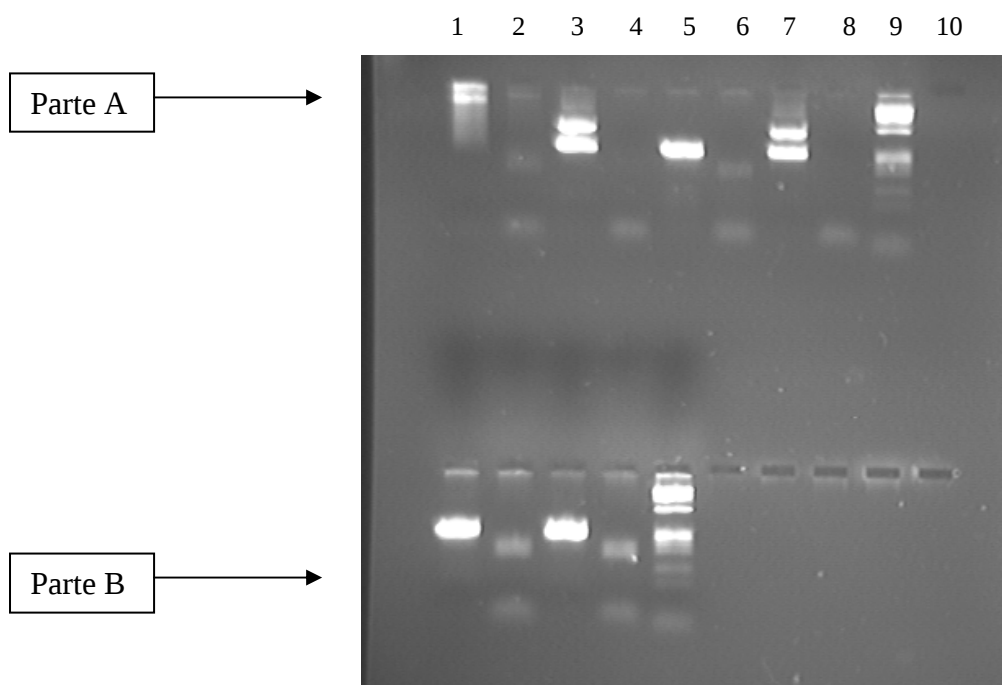


Figura 8. Gel de agarose 2% ilustrando os resultados iniciais da 1ª *PCR* (lanes ímpares) e 2ª *PCR* (lanes pares). **Parte A:** lanes 1 e 2- amostra de indivíduo do gênero masculino portador da síndrome do cromossomo X frágil (no lane 1 a altura da banda visualizada corresponde a um alelo mutado, onde calcula-se que o número de repetições CGG seja maior do que 300 repetições; no lane 2 visualiza-se um arraste discreto, entretanto, Tassone et al. (2008) não preconiza a realização da segunda *PCR* para afetados do gênero masculino); lanes 3 e 4 – amostra de indivíduo do gênero feminino, no caso, mãe do indivíduo portador da Síndrome (no lane 3 é possível visualizar duas bandas que confirmam a heterozigotidade da mãe, ou seja, a mesma possui um alelo normal e um alelo pré-mutado; no lane 4 não aparece banda, o que confirma a presença de um alelo pré-mutado, ao contrário de um alelo mutado, onde, segundo Tassone et al. (2008), apareceria um extenso arraste); lanes 5 e 6- amostra de indivíduo do gênero feminino, prima do portador da Síndrome (no lane 5, a presença de uma única banda indica homozigose para o alelo normal; no lane 6 aparece uma banda fraca indicando a presença de pequenos produtos da *PCR* que são produzidos com o primer quimérico, confirmando a existência do alelo normal); lanes 7 e 8 – indivíduos do gênero feminino, irmã da mãe do portador da Síndrome, (o padrão de bandas é igual a dos lanes 3 e 4, o que era esperado, já que as amostras correspondem à duas irmãs que tiveram filhos do gênero masculino com a Síndrome); lane 9 – marcador de peso molecular *Phi X 174 Hae III (New England)*. **Parte B:** lanes 1 e 2; 3 e 4 – possuem amostras de indivíduos do gênero feminino (controle negativo) (o padrão de bandas é o mesmo dos lanes 5 e 6 da Parte A, o que comprova a normalidade dos alelos); lane 5 – marcador de peso molecular *Phi X 174 Hae III (New England)*; Lane 6 – amostra “branco” para a 1ª *PCR*; Lane 7 – amostra “branco” para a 2ª *PCR*.

É importante salientar que Tassone et al. (2008) menciona a utilização de duas diferentes enzimas, a *Expand Long Template PCR System* (Roche Diagnostics) e a *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics). No entanto, ao ilustrar os resultados na publicação, os autores não mencionam qual enzima foi utilizada. A diferença entre as duas enzimas é que para a utilização da primeira (*Expand Long Template PCR System*) há necessidade de realizar *hot start*, ou seja, a polimerase foi adicionada após a desnaturação inicial. Como nesse método de *PCR* é necessária uma agressiva desnaturação do DNA (98°C por 10 minutos), se a enzima polimerase fosse adicionada já no início do processo ela perderia sua eficiência precocemente. Procedimentos utilizando *hot start* para enzima *Expand Long* também foram descritos por Houdayer et al. (1999) e Hecimovic et al. (2001) em *PCR* para triagem da SXF.

Tassone et al. (2008) menciona a utilização da enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics) para evitar a necessidade de realizar *hot start*. Apesar de não haver detalhamento da utilização dessa enzima, por exemplo, qual dos tampões que deveria ser empregado, qual a concentração de magnésio, quais as condições de ciclagem, etc, buscou-se a padronização. Mesmo após inúmeras tentativas, observou-se o sucesso da amplificação somente na 1ª *PCR* (Figura 9a). A 2ª *PCR*, que permitiria dar o resultado conclusivo, principalmente para mulheres que apresentam apenas uma banda, não amplificava (Figura 9b).

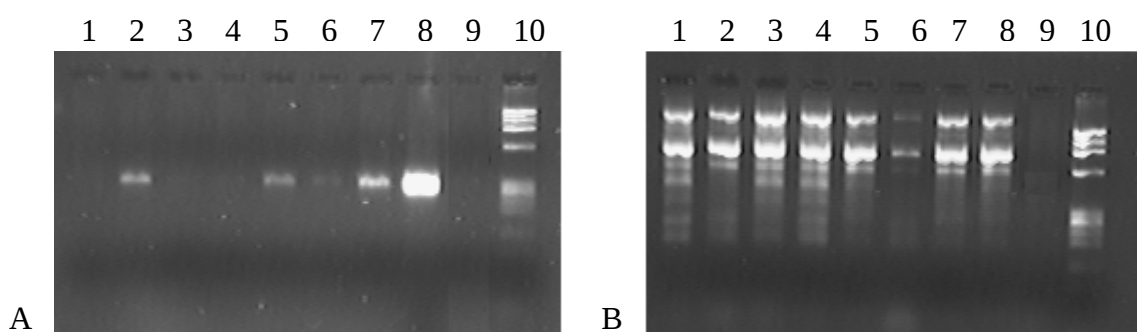


Figura 9. Gel de agarose 2% ilustrando resultados do método utilizando a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics). **A**, resultados da 1ª *PCR*: **lanes 1 à 4**, amostras de indivíduos do gênero masculino. **Lanes 5 à 7**: amostras de indivíduos do gênero feminino. **Lane 8**: amostra de indivíduo do gênero feminino com alelos normais para a SXF (controle negativo). **Lane 9**: amostra “branco”. **Lane 10**: marcador de peso molecular *Phi X 174 Hae III* (New England). **B**, resultados da 2ª *PCR* onde todas as amostras apresentaram o mesmo padrão de bandas inespecíficas, demonstrando a não especificidade da 2ª *PCR*.

Assim, diante dos resultados apresentados, decidiu-se abandonar a utilização da enzima *FastStart Taq DNA Polymerase*. Vale ressaltar que recentemente, Fernandez-Carvajal

et al. (2009), apresentam resultados satisfatórios em um artigo de triagem da SXF, na qual utilizaram a técnica de Tassone et al. (2008), com o uso da enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics). Porém, no referido artigo também há ausência de informações detalhadas quanto ao uso dos demais reagentes.

5.2 Comprovação da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade do método

Foi realizada a triagem do diagnóstico da SXF por PCR de 78 amostras de indivíduos dos gêneros feminino e masculino. Dentre eles ilustra-se o heredograma (Figuras 10 e 11) de duas famílias que possuem indivíduos afetados pela SXF e indivíduos que segregam o alelo PM ou FM.

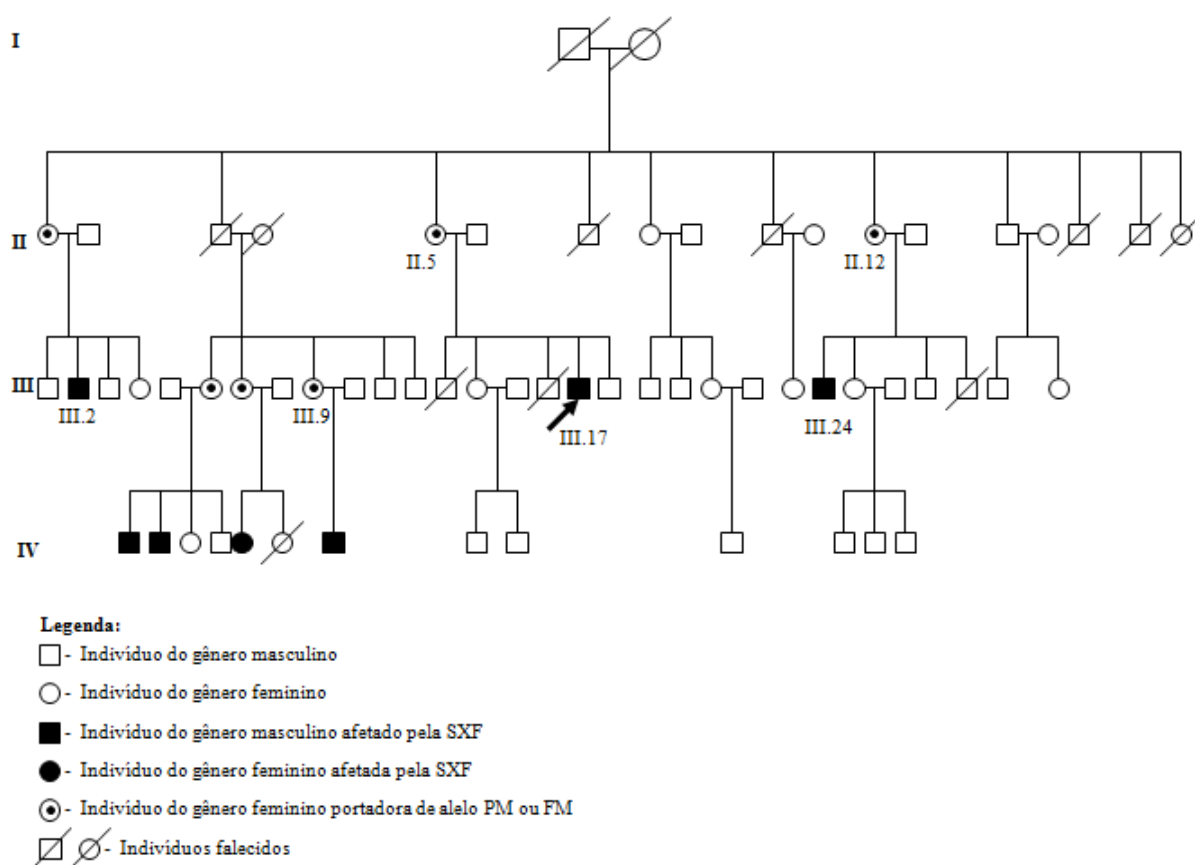


Figura 10. Heredograma da Família 1. Os indivíduos indicados por números romanos (geração) e arábicos (indivíduo) são os que aceitaram participar deste estudo. A seta apontando o indivíduo III. 17 indica que o mesmo é o probando.

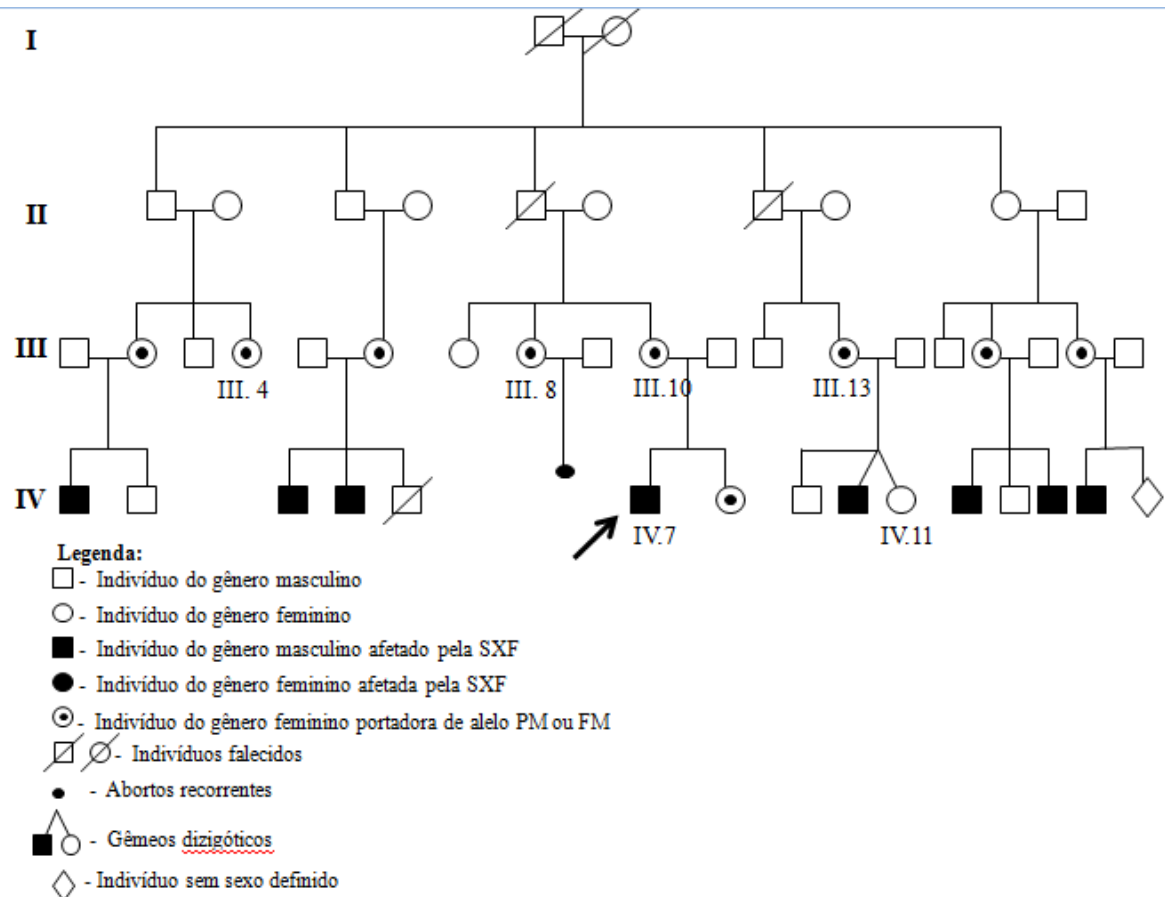


Figura 11. Heredograma da Família 2. Os indivíduos indicados por números romanos (geração) e arábicos (indivíduo) são os pacientes que aceitaram participar deste estudo. A seta apontando o indivíduo IV. 7 indica que o mesmo é o probando.

Os resultados das triagens diagnósticas por *PCR* dos pacientes participantes deste estudo estão agrupados na Tabela 2, juntamente com os resultados obtidos por *Southern blot*.

Tabela 2. Resultados das triagens por *PCR* e dos diagnósticos por *Southern blot*

Número de Indivíduos (%)	Gênero	Resultado por <i>PCR</i>	Resultado por <i>Southern blot</i>
01 (1,3)	masculino	NL (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	NL
02 (2,5)	feminino	NL (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	NL
10 (12,8)	masculino	PM (1 ^a <i>PCR</i>)	PM
02 (2,5)	masculino	FM (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	PM
20 (25,7)	feminino	PM (1 ^a <i>PCR</i>)	PM
02 (2,5)	feminino	FM (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	PM
26 (33,4)	masculino	FM (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	FM
11 (14,1)	feminino	FM (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	FM
01 (1,3)	masculino	PM (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	PM e FM (mosaicismo)
03 (3,9)	feminino	Inconclusivo (1 ^a e 2 ^a <i>PCRs</i>)	FM
Total 78 (100)			

Obteve-se o resultado de triagem por *PCR* de 75 amostras. Para 3 indivíduos, houve resultado inconclusivo. Segundo Tassone et al. (2008), em casos em que o método de triagem por *PCR* não é conclusivo, as amostras devem ser encaminhadas para a realização do *Southern blot*, que é o método padrão-ouro de diagnóstico da SXF.

Dos resultados conclusivos referentes a 75 amostras de DNA, 5 não coincidiram com aquele fornecido pelo exame *Southern blot*, perfazendo 6,7%. Dessas 5 amostras com resultados não coincidentes para os dois métodos, 4 delas referem-se a indivíduos triados por *PCR* como FM, quando por *Southern blot* os mesmos foram diagnosticados como PM. Nessas quatro amostras, como não houve a amplificação de nenhum alelo PM na 1^a *PCR*, realizou-se a 2^a *PCR* e observou-se um extenso arraste, que segundo Tassone et al., (2008), demonstra a existência de alelo FM. Assim, classificaram-se os indivíduos como portadores de alelos FM. Segundo Tassone et al. (2008), o método tem a capacidade de detectar na 1^a *PCR* alelos até o intervalo superior de PM (aproximadamente 200 repetições CGG). Caso os alelos não sejam identificados, a 2^a *PCR* identificaria a presença dos alelos com PM, através da visualização do arraste. Porém, os próprios autores sugerem que em casos onde houver o arraste na 2^a *PCR*, as

amostras devem submetidas ao *Southern blot* para a legitimação dos alelos. Assim, entende-se que sempre que houver a necessidade da utilização da 2ª *PCR* e observar-se como resultado, a presença de um arraste extenso, não é possível identificar precisamente se o alelo é PM ou FM. Talvez a não coincidência de resultados entre a *PCR* e o *Southern blot* possa estar no fato do presente método da *PCR* ter sido realizado com adaptações do artigo de Tassone et al. (2008), o qual não mencionava detalhes importantes sobre a enzima, como a quantidade utilizada da mesma e as condições para realização do *hot start*

A quinta amostra com resultado não coincidente refere-se a um indivíduo diagnosticado por *Southern blot* como mosaico para os alelos PM e FM. Para o alelo PM o método da *PCR* adaptado de Tassone et al. (2008) funcionou, identificando uma banda amplificada na 1ª *PCR*. Assim, o indivíduo foi classificado como portador de alelo PM. Porém, quando se obteve o resultado do *Southern blot*, observou-se que o indivíduo também era portador de alelo FM, sendo mosaico. Por causa desse resultado, decidiu-se realizar a 2ª *PCR* para verificar se haveria a presença de um alelo expandido (arraste). O resultado observado foi um arraste extenso, como o observado no caso dos 4 indivíduos com alelos PM pelo *Southern blot* e diagnosticados como FM pelo presente método da *PCR*.

Considerando os indivíduos apresentados nas figuras 11 e 12 que foram investigados neste estudo, é válido informar o que consta da Tabela 3.

Tabela 3. Informação da triagem por *PCR* e do diagnóstico por *Southern blot* dos indivíduos apresentados nas figuras 11 e 12.

Heredograma	Indivíduo	Gênero	Resultado por <i>PCR</i>	Resultado por <i>Southern blot</i>
Figura 10	II. 5	Feminino	PM	PM
	II.12	Feminino	FM	FM
	III.2	Masculino	FM	FM
	III. 9	Feminino	FM	PM
	III.17	Masculino	PM	PM e FM (mosaico)
	III.24	Masculino	FM	FM
Figura 11	III. 4	Feminino	PM	PM
	III. 8	Feminino	PM	PM
	III.10	Feminino	PM	PM
	III.13	Feminino	PM	PM
	IV.7	Masculino	FM	FM
	IV. 11	Feminino	NL	NL

Foi possível observar que houve 83,3% de concordância dos resultados obtidos entre os dois métodos de investigação da SXF nos indivíduos das duas famílias apresentadas nos heredogramas. Apenas o resultado de um indivíduo mosaico para os alelos PM e FM e outro de um indivíduo PM por *Southern blot*, totalizando (16,7%) não coincidiram com os resultados obtidos por *PCR*.

Realizou-se a análise da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade dos resultados obtidos entre os dois métodos. A análise foi feita de três formas: (i) englobando todos os 75 resultados; (ii) englobando somente os resultados que mostraram a presença de alelos PM e NL por *PCR* (34 amostras); (iii) englobando somente os resultados que demonstraram a presença de alelos FM e NL por *PCR* (44 amostras). Os resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 4. Para maiores detalhes vide ANEXOS.

Tabela 4. Resultados da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade.

Alelos	Número de resultados analisados	Exatidão (Acurácia)	Sensibilidade	Especificidade
PM, FM e NL	75	100%	100%	100%
PM e NL	34	89,5%	88,6%	100%
FM e NL	44	88, 9%	97,4%	42, 9%

Obs: A soma do número de resultados analisados (em PM e NL; FM e NL = 78) não coincidem com o total de resultados conclusivos (75), pois houve a repetição dos alelos NL nas análises.

É possível observar que o método da *PCR* adaptado de Tassone et al., (2008) é acurado, isto é, apresenta exatidão de 100% quando todos os alelos são analisados conjuntamente (ANEXO A). O mesmo ocorre para a sensibilidade - que é a capacidade do teste em detectar a doença quando ela está presente – e para a especificidade - que é a capacidade do método em diagnosticar a ausência da doença em casos em que ela realmente não existe. Isto comprova que, conforme apresentado por Tassone et al. (2008), o método proposto tem a capacidade de detectar a presença de todos os tipos de alelos. Fernandez-Carvajal et al. (2009) em um estudo de triagem populacional, demonstram a aplicabilidade do método de Tassone et al., (2008), em detectar todos os tipos de alelos, inclusive alelos GZ. Vale lembrar que os alelos GZ que não foram abordados neste presente estudo. Na literatura científica, outro trabalho enfocando um método de triagem da SXF através de análise do estado de metilação, já havia demonstrado em 29 pacientes, ser 100% específico e sensível (ROSALES-REYNOSO et al., 2007).

Quando os tipos de alelos são analisados separadamente, a exatidão (acurácia), a sensibilidade e a especificidade variam. No caso da análise feita com as amostras de indivíduos diagnosticados por *PCR* como PM e NL, a sensibilidade e a exatidão (acurácia) diminuem. Como citado anteriormente, o método de *PCR* não conseguiu detectar o verdadeiro alelo PM (por *Southern blot*) em 4 indivíduos. Assim, os indivíduos foram classificados como FM, erroneamente pela *PCR*. Já a especificidade, permanece em 100%, demonstrando que o teste por *PCR* conseguiu diagnosticar todos os indivíduos NL, ou seja, indivíduos com resultados negativos verdadeiros para a doença (ANEXO B). Sabbatini (1995), já havia citado que quando o teste possui alta especificidade, a sensibilidade diminui, devido ao fato de existirem muitos falso-negativos. Neste caso os falso-negativos são os pacientes que deveriam ser classificados como PM e que não foram, já que, pela *PCR* foram classificados como FM.

Na análise realizada com as amostras de indivíduos diagnosticados como FM e NL, a exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade diminuem. Isso ocorre, novamente, devido ao fato do método da *PCR* diagnosticar os 4 indivíduos com alelos PM, como FM. Além disso, o método da *PCR* diagnosticou erroneamente um indivíduo mosaico para os alelos PM e FM, somente como portador de alelo PM (ANEXO C). Nesse caso, o teste torna-se pouco específico, pois o número de pacientes falso-negativos aumenta (1). Ou seja, o teste tende a diagnosticar os indivíduos como portadores de FM, quando na verdade os mesmos são portadores do alelo PM. Além disso, no caso do mosaicismo, o teste da *PCR* não diagnosticou a presença do alelo FM juntamente com o PM. A sensibilidade diminuiu para 97,4%, demonstrando que o método por *PCR* é ainda capaz de detectar a FM na maioria dos casos em que está presente. Sabbatini (1995) descreveu que quando a sensibilidade é alta, a especificidade diminui, devido ao fato de gerarem falso-negativos. Neste caso o falso-negativo é o indivíduo que tem também o alelo FM e que a *PCR* não o detectou.

Assim, apesar da dificuldade encontrada em diferenciar alelo PM e FM em alguns indivíduos, o método apresentado neste estudo parece ser útil para a triagem da SXF, pois detecta os indivíduos com alelos NL e a maioria dos pacientes PM e FM. Ressalta-se que quando alelos PM não são diagnosticados na 1ª *PCR*, e na 2ª *PCR* ocorre um extenso arraste, o diagnóstico fica inconclusivo, não podendo concluir se há um alelo PM muito extenso ou um FM. Desta forma, o *Southern blot* continua sendo necessário, inclusive nos casos em que se deseja saber o estado de metilação dos alelos e/ou definir o tamanho das repetições CGG.

5.3 Avaliação da aplicação do método adaptado de Tassone et al. (2008), utilizando DNA obtido de diferentes materiais biológicos

Foi realizada a coleta de três tipos de material biológico diferentes: gotas de sangue em cartão FTA, sangue coletado pelo sistema à vácuo e células da mucosa oral. Os materiais biológicos foram coletados de um mesmo indivíduo do sexo feminino com alelo NL para a SXF (voluntário K.M.C.C). A extração do DNA desse indivíduo, foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Materiais e Métodos, itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3. Foram feitas as duas *PCRs* de acordo com os itens 4.3 e 4.4 de Materiais e Métodos. Obteve-se sucesso para a 1ª e 2ª *PCRs* em todas as amostras de DNA dos diferentes materiais biológicos. Para a 1ª *PCR* foi observado que as bandas obtidas de DNA de sangue extraído com solventes orgânicos se mostraram menos intensas que as obtidas de DNA extraído de sangue coletado em cartão FTA, as quais foram menos intensas que as bandas observadas de DNA de células da mucosa

oral também extraído com solventes orgânicos (Figura 12). Optou-se por manter a coleta de material biológico dos pacientes com o cartão FTA (*Whatman*), para acompanhar a metodologia descrita por Tassone et al. (2008).

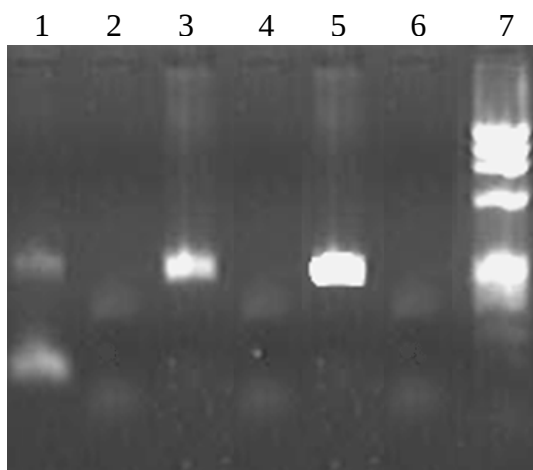


Figura 12. Gel de agarose a 2% contendo resultados das duas *PCRs* de amostras de DNA de mesmo indivíduo do gênero feminino portadora de alelos normais para a SXF. As amostras foram extraídas de materiais biológicos diferentes. Nos lanes ímpares é possível visualizar os resultados da 1ª *PCR* e nos pares, os resultados da 2ª *PCR*. **Lanes 1 e 2** amostra de DNA de sangue extraído com solventes orgânicos. **Lanes 3 e 4** amostra de DNA extraída de gotas de sangue em cartão FTA. **Lanes 5 e 6:** amostra de DNA de células da mucosa oral extraído com solventes orgânicos. **Lane 7:** marcador de peso molecular *Phi X 174 Hae III* (*New England*). Ressalta-se que as amostras “branco” não são apresentadas na figura.

No artigo de Tassone et al. (2008), foi utilizado DNA extraído de sangue total. Posteriormente, a mesma técnica foi aplicada em DNA obtido de gotas de sangue coletadas em cartão FTA (*Whatman*). Os autores descreveram sucesso na reprodução da técnica com o DNA obtido dos cartões, com discretas variações. Diante disso, eles sugerem a aplicação do método em sangue coletado em cartão FTA, pois utiliza pouco material biológico e pode ser facilmente aplicado em recém-nascidos. Holden et al. (1996) já haviam realizado *PCR* utilizando DNA eluído de sangue coletado em cartões para analisar as regiões de repetições trinucleotídeos do gene *FMR1*. Segundo os autores, um número de até 75 repetições de CGG (correspondente aos alelos NL e PM) foi identificado em *PCR* com DNA extraído de sangue coletado de modo convencional. Os mesmos resultados foram obtidos na *PCR* com DNA eluído de sangue coletado em cartões. Porém, segundo os autores, a partir desse mesmo material, não se obteve resultado da *PCR* quando foram analisadas grandes repetições de CGG. Mesmo assim, os autores sugerem a utilização de sangue coletado em cartões com as finalidades de: estabelecer frequências alélicas; realizar triagem genética; e/ou para mapeamento. As vantagens de se utilizar amostras de sangue coletadas com cartão FTA são:

(i) não há necessidade de treinamento específico para coleta; (ii) o transporte e a estocagem das amostras é fácil; (iii) a coleta de sangue de crianças utilizando a lanceta para picada digital é menos traumática que a coleta por seringas ou tubos à vácuo; (iv) rápida extração de DNA.

Por meio dos resultados aqui apresentados, é possível verificar que a utilização de células da mucosa oral é uma importante opção à utilização de sangue para obtenção de DNA para realização do método de triagem da SXF. Normalmente, alguns pacientes, na maioria crianças, tendem a relutar em fornecer sangue por medo das agulhas. Pelas características psicológicas e cognitivas dos pacientes com SXF, há a tendência de serem agressivos no momento da coleta de sangue, o que dificulta, ou até impossibilita o procedimento. Nesse aspecto, a coleta de células da mucosa oral acaba sendo uma opção menos invasiva, mais tranquila e melhor aceita pelos pacientes. Por isso foi importante demonstrar os resultados eficientes das *PCRs* realizadas com DNA extraído de células da mucosa oral. Hagerman et al. (1994), já haviam descrito um programa piloto utilizando saliva para identificar SXF em crianças com dificuldades de aprendizagem. Os autores conseguiram obter resultados equivalentes àqueles obtidos com sangue. Cristofolini et al. (2006), por sua vez, descreveram um trabalho onde comparavam a realização de PCR de triagem da SXF, com DNA extraído de sangue e DNA extraído de células da mucosa oral. Nesse trabalho os autores relataram que a quantidade de DNA obtida de células da mucosa oral é menor do que a quantidade obtida de sangue, provavelmente por isso em alguns casos não houve sucesso da *PCR*. Porém, nos casos em que a *PCR* apresentou resultados, os mesmos foram equivalentes aos observados quando houve utilização de DNA extraído de sangue. Assim, o uso de células da mucosa oral é uma importante alternativa na obtenção de DNA para triagem da SXF, principalmente em pacientes com agravada deficiência mental. Além disso, outras vantagens do uso de células da mucosa oral podem ser observadas, segundo Cristofolini et al. (2006): coleta fácil e indolor; os pais podem ajudar na coleta; os resultados obtidos são confiáveis.

5.4 Estimativa do custo do método no mercado nacional e do tempo necessário de execução

Após a padronização do método com a enzima *Expand Long PCR System (Roche Diagnostic)*, foi possível realizar uma estimativa do custo para o mercado nacional e do tempo necessário para sua execução. Na estimativa também foram incluídas as diferentes formas de

obtenção do DNA. Os valores apresentados na Tabela 5 referem-se aos custos orçados em junho de 2010.

Tabela 5. Estimativa de custo e tempo para realização do método da *PCR* por paciente.

Etapa		Valor Estimado (R\$)	Tempo estimado
Obtenção e Extração do DNA	Sangue (Cartão <i>FTA</i>)	5,50	2 horas
	Sangue (Sistema à vácuo)	2,50	8 horas
	Células da mucosa oral	2,00	7 horas
1° e 2° PCR		2,00	7 horas
Eletroforese e visualização do resultado		1,50	2 horas

É possível observar que o método de obtenção e extração do DNA por células da mucosa oral tem o menor custo, mas demanda mais tempo. No entanto, utilizando o cartão *FTA* (*Whatman*), como feito por Tassone et al. (2008), observou-se que o custo foi comparativamente mais elevado, mas se mostrou o método mais rápido. Fernandez-Carvajal et al. (2009) em um estudo populacional na Espanha, também afirmam ser rápido o método de Tassone et al. (2008) que utiliza sangue coletado em cartões *FTA*. Em outro estudo molecular da SXF que utilizou DNA obtido de sangue coletado em cartões, os autores mencionam a rápida aquisição de resultados (HOLDEN et al., 1996)

Como já dito anteriormente, o método padrão-ouro para diagnóstico da SXF é o *Southern blot* (utilizando sondas marcadas com radioisótopo). Segundo informações de um laboratório que realiza esse método rotineiramente, há um custo de R\$ 650,00, com entrega em 60 dias (informações de junho de 2010). Considerando os resultados deste trabalho, observa-se que o custo nacional do método de Tassone et al. (2008) incluindo a coleta do sangue por cartão *FTA*, é de R\$ 9,00 com demanda de 11 horas para realização do teste de triagem. Portanto, nota-se que o custo para realização do presente método representa aproximadamente 1,4% do custo e 0,77% do tempo necessário para realização do *Southern blot*.

Além de Tassone et al. (2008), outros autores descrevem técnicas de triagem por *PCR* mais rápidas e com uma relação custo-benefício melhor do que o *Southern blot*. Haddad et al. (1996), por exemplo, apresenta um método de detecção de alelo FM em homens, que segundo os autores é de baixo custo e rápido. Panagapoulos et al. (1999), descrevem uma técnica que posteriormente foi aplicada por Rosales-Reynoso et al. (2007). Segundo os autores, essa

técnica que detecta alelos através do estado de metilação, apresenta alta concordância de resultados com o *Southern blot*, porém demanda menos tempo de realização e possui melhor custo-benefício. Dahl et al. (2007), apresentam uma técnica de *PCR* em tempo real que realiza o diagnóstico através do estado de metilação dos alelos (*MS-PCR*). Essa técnica, segundo os autores, representa um procedimento de triagem inicial, com baixo custo.

O baixo custo aliado à rapidez do método de triagem por *PCR* (comprovados neste trabalho) reforçam a importância da utilização de métodos de *PCR* como triagem da SXF. A literatura se mostra farta em apresentar a importância da utilização de métodos de *PCR* como triagem, já que se tem buscado frequentemente modificações na técnica de *PCR* afim de obter melhores resultados (HADDAD et al., 1996; HAMDAM et al., 1997; PANAGAPOULOS et al., 1999; SALUTO et al., 2005; ROSALES-REYNOSO et al., 2007; DAHL et al., 2007; TASSONE et al., 2008). Assim, deveria-se em caso de suspeita da SXF, aplicar inicialmente o método de triagem por *PCR* e de acordo com Saluto et al., (2005), o *Southern blot* seria aplicado somente para casos em que não foi possível obter o diagnóstico da SXF, ou nos quais necessita-se saber o estado de metilação dos alelos. E ainda, conforme descreve Fernandez-Carvajal et al., (2009), para determinar o tamanho dos alelos.

6. CONCLUSÕES

Apesar da ausência de informações metodológicas, obteve-se sucesso na reprodução do método da *PCR* para triagem da SXF descrito por Tassone et al. (2008) utilizando-se enzima *Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics)*, que exige *hot start*. Após inúmeras tentativas em reproduzir o método com a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics)* não foi possível obter resultados para 2ª *PCR*.

Com o método de triagem adaptado de Tassone et al. (2008) apresentado neste estudo, foi possível obter resultados para 75 das 78 amostras de indivíduos investigadas. Dos 75 resultados por *PCR*, 70 foram coincidentes com o resultado obtido por *Southern blot*. Para os 5 resultados não coincidentes, houve falha do método da *PCR* em diferenciar corretamente alelos PM e FM. As análises da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade demonstraram que o método é capaz de identificar a presença dos diferentes tipos de alelos para a SXF em 100% dos pacientes. Porém a diferenciação dos alelos PM e FM não é precisa, o que promoveu a diminuição da exatidão (acurácia), sensibilidade e especificidade do método da *PCR*.

Houve reprodutibilidade dos resultados da triagem por *PCR* adaptada utilizando DNA obtido de diferentes materiais biológicos/métodos de extração. Esse resultado é importante, principalmente, pois facilita a realização do exame em casos em que há relutância na doação de material biológico, como o sangue. Além disso, permite a aplicação de métodos de coleta em que não é necessária a existência de pessoas especializadas e cujo material pode ser facilmente transportado e armazenado.

O custo aproximado para a realização da triagem da SXF por *PCR* adaptada no mercado nacional, considerando a coleta com cartão *FTA*, é de R\$ 9,00 com demanda de 11 horas. Independentemente do material biológico a ser utilizado para a identificação da SXF, a realização do método da *PCR*, é mais rápido e econômico que o método *Southern blot*. Isso satisfaz um dos principais requerimentos de um teste de triagem: ser rápido e ter um bom custo-benefício.

Em conjunto, os resultados indicam que método da *PCR* adaptado de Tassone et al., (2008) é útil como triagem da SXF, no entanto, o *Southern blot* continua configurando o método padrão-ouro para diagnóstico molecular da SXF.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-IV-TR- Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 3rd ed. Washington, 2000.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. **BIOESTAT**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: ONG Mamiraua, 2007.
- AZIZ, M.; STATHOPULU, E.; CALLIAS, M.; TAYLOR, C.; TURK, J.; OOSTRA, B.; WILLEMSSEN, R.; PATTON, M. Clinical features of boys with fragile X premutations and intermediate alleles. **Am. J. Med. Genet.**, v. 121B, n. 1, p. 119-127, Aug. 2003.
- BAILEY, D. B. Jr.; SIDERIS, J.; ROBERTS, J. E.; HATTON, D. Child and genetic variables associated with maternal adaptation to fragile X syndrome: a multidimensional analysis. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 146, n. 6, p. 720-729, Mar. 2008.
- BANERJEE, P.; SCHOENFELD, B. P.; BELL, A. J.; CHOI, C. H.; BRADLEY, M. P.; HINCHEY, P.; KOLLAROS, M.; PARK, J. H.; McBRIDE, S. M.; DOCKENDORFF, T. C. Short-and long-term memory are modulated by multiple isoforms of the fragile X mental retardation protein. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 19, p. 6782-6792, May 2010.
- BARDONI, B.; MANDEL, J. L. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 3, p. 284-296, June 2002.
- BARDONI, B.; SITTler, A.; SHEN, Y.; MANDEL, J. L. Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. **Neurobiol. Dis.**, v. 4, n. 5, p. 329-336, Jan. 1997.
- BASSEL, G. J.; WARREN, S. T. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. **Neuron**, v. 60, p. 201-214, Oct. 2008.
- BEAR, M. F.; HUBER, K. M.; WARREN, S. T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. **Trends. Neurosci.**, v. 27, n. 7, p. 370-377, July 2004.
- BECHARA, E.; DAVIDOVIC, L.; MELKO, M.; BENSaid, M.; TREMBLAY, S.; GROSGEORGE, J.; KHANDJIAN, E. W.; LALLI, E.; BARDONI, B. Fragile X related protein 1 isoforms differentially modulate the affinity of fragile X mental retardation protein for G-quartet RNA structure. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 35, n. 1, p. 299-306, Dec. 2006.
- BEILINA, A.; TASSONE, F.; SCHWARTZ, P. H.; SAHOTA, P.; HAGERMAN, P. J. Redistribution of transcription start sites within the *FMR1* promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. **Hum. Mol. Genet.**, v. 13, n. 5, p. 543-549, Jan. 2004.
- BELMONTE, M. K.; BOURGERON, T. Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. **Nat. Neurosci.**, v. 9, n. 10, p. 1221-1225, Oct. 2006.
- BERRY-KRAVIS, E. Epilepsy in fragile X syndrome. **Dev. Med. Child. Neurol.**, v. 44, n. 11, p. 724-728, Nov. 2002.

BERRY-KRAVIS, E.; ABRAMS, L.; COFFEY, S. M.; HALL, D. A.; GRECO, C.; GANE, L. W.; GRIGSBY, J.; BOURGEOIS, J.; FINUCANE, B.; JACQUEMONT, S.; BRUNBERG, J. A.; ZHANG, L.; LIN, J.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J.; LEEHEY, M. A. Fragile X associated tremor / ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. **Mov. Disord.**, v. 22, n. 14, p. 2018-2030, Oct. 2007.

BOURGEOIS, J.; COFFEY, S.; RIVERA, S.; HESSI, D.; GANE, L. W.; TASSONE, F.; GRECO, C.; FINUCANE, B.; NELSON, L.; KRAVIS, E. B.; GRIGSBY, J.; HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. Fragile X premutation disorders – expanding psychiatric perspective. **J. Clin. Psychiatry.**, v. 70, n. 6, p. 852-862, June 2009.

BREThERICK, K. L.; FLUKER, M. R.; ROBINSON, W. P. *FMR1* repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. **Hum. Genet.**, v. 117, n. 4, p. 376-382, Aug. 2005.

BUDIMIROVIC, D. B.; BUKELIS, I.; COX, C.; GRAY, R. M.; TIERNEY, E.; KAUFMANN, W. E. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: differential contribution of adaptive socialization and social withdrawal. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 140, n. 17, p. 1814-1826, Sept. 2006.

CEDERBAUM, S. Newborn screening: the spigot is open and threatens to become a flood. **J. Pediatr.**, v. 151, n. 2, p.108-110, Aug. 2007.

CHEN, L.; HADD, A.; SAH, S.; FILIPOVIC-SADIC, S.; KROSTING, J.; SEKINGER, E.; PAN, R.; HAGERMAN, P. J.; STENZEL, T. T.; TASSONE, F.; LATHAM, G. J. An information rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. **J. Mol. Diagn.**, July 2010. In press.

CHIURAZZI, P.; KOSAZ, L.; NERI, G. Unstable triplets and their mutation mechanism: size reduction of the CGG repeat vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 517-521, July 1994.

CHONCHAIYA, W.; SCHNEIDER, A.; HAGERMAN, R. J. Fragile X : a family of disorders. **Pediatrics**, v. 56, p. 165-186, 2009.

CHRISTOFOLINI, D. M.; LIPAY, M. V. N.; RAMOS, M. A. P.; BRUNONI.; MELARAGNO, M. I. Screening for fragile X syndrome among Brazilian mentally retarded male patients using PCR from buccal cell DNA. **Genet. Mol. Res.**, v. 5, n. 3, p. 448-453, July 2006.

COFFEE, B.; KELTH, 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, p. 503-514, Oct. 2009.

COFFEY, S. M.; COOK, K.; TARTAGLIA, N.; TASSONE, F.; NGUYEN, D. V.; PAN, R.; BRONSKY, H. E.; YUHAS, J.; BORODYANSKAYA, M.; GRIGSBY, J.; DOERFLINGER, M.; HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. Expanded clinical phenotype of women with the *FMR1* premutation. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 146, n. 8, p. 1009-1016, Apr. 2008.

- CORNISH, K. M.; TURK, J.; HAGERMAN, R. The fragile X continuum: new advances and perspectives. **J. Intellect. Disabil. Res.**, v. 52, n. 6, p. 469-482, June 2008.
- CRAWFORD, D. C.; ACUNA, J. M.; SHERMAN, S. L. *FMR1* and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genet. Med.**, v. 3, n. 5, p. 359-371, Sept. 2001.
- DAHL, C.; GRONSKOV, K.; LARSEN, L. A.; GULDBERG, P.; BRONDUM-NIELSEN, K. A homogeneous assay for analysis of *FMR1* promoter methylation in patients with Fragile X Syndrome. **Clin. Chem.**, v. 53, n. 4, p. 790-793, Jan. 2007.
- D'HULST, C.; KODY, R. F. Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy. **J. Med. Genet.**, v. 46, p. 577-584, Jan. 2009.
- DE GRAAFF, E.; WILLEMSSEN, R.; ZHONG, N.; DE DIE-SMULDERS, C. E.; BROWM, W. T.; FRELING, G.; OOSTRA, B. Instability of the CGG repeat and expression of the *FMR1* protein in a male fragile X patient with a lung tumor. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 57, n. 3, p. 609-618, Sept. 1995.
- DE VRIJ, F. M.; LEVENGA, J.; VAN DER LINDE, H. C.; KOEKKOEK, S. K.; DE ZEEUW, C. I.; NELSON, D. L.; OOSTRA, B. A.; WILLEMSSEN, R. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in *FMR1* KO mice. **Neurobiol. Dis.**, v. 31, n. 1, p. 127-132, July 2008.
- DENMAM, R. B.; SUNG, Y. J. Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 292, n. 4, p. 1060-1069, Apr. 2002.
- DEVYS, D.; LUTZ, Y.; ROUYER, N.; BELLOCQ, J. P.; MANDEL, J. L. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X permutation. **Nature Genet.**, v. 4, p. 335-340, Aug. 1993.
- DODDS, E. D.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. J.; LEBRILLA, C. B. Polymerase chain reaction, nuclease digestion, and mass spectrometry based assay for the trinucleotide repeat status of the fragile X mental retardation 1 gene. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 5533-5540, July 2009.
- DOLEN, G.; BEAR, M. F. Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. **J. Physiol.**, v. 586, n. 6, p. 1503-1508, Mar. 2008.
- DOMBROWSKI, C.; LÉVESQUE, S.; MOREL, M. L.; ROUILLARD, P.; MORGAN, K.; ROUSSEAU, F. Premutation and intermediate – size *FMR1* alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, n. 4, p. 371-378, Feb. 2002.
- EBERHART, D. E.; MALTER, H. E.; FENG, Y.; WARREN, S. T. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. **Hum. Mol. Genet.**, v. 5, n. 8, p. 1083-1091, May 1996.
- EICHLER, E. E.; RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; NELSON, D. L. Fine structure of the human *FMR1* gene. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2, p. 1147-1153, Aug. 1993.

EICHLER, E. E.; HOLDEN, J. J.; POPOVICH, B. W.; REISS, A. L.; SNOW, K. Length of uninterrupted CGG repeat determines instability in the *FMR1* gene. **Nat. Genet.**, v. 8, p. 88-94, Sept. 1994.

FARZIN, F.; PERRY, H.; HESSL, D.; LOESCH, D.; COHEN, J.; BACALMAN, S.; GANE, L.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorders in boys with the fragile X premutation. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 27, n. 2, p. 5137-5144, Apr. 2006.

FARZIN, F.; WHITNEY, D.; HAGERMAN, R. J.; RIVERA, S. M. Contrast detection in infants with fragile X syndrome. **Vision. Res.**, v. 48, n. 13, p. 1471-1478, June 2008.

FERNANDEZ-CARVAJAL, I.; WALLCHLEWTCZ, P.; XLAOSEN, X.; PAN, R.; HAGERMAN, P. J.; TASSONE, F. Screening for expanded alleles of the *FMR1* gene in blood spots from newborn males in a spanish population. **J. Mol. Diagn.**, v. 11, n. 4, p. 324-329, July 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, n. 3, p. 399-408, Mar. 2010.

FU, Y. H.; KUHL, D. P. A.; PIZZUTI, A.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J. S.; RICHARDS, S.; VERKERK, A. J. M. H.; HOLDEN, J. J. A.; FENWICK, R. G. Jr.; WARREN, S. T.; OOSTRA, B. A.; NELSON D. L.; CASKEY, C. T. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1047-1058, Dec. 1991.

GANE, L. W.; CRONISTER, A. Genetic counseling. In: HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. (Ed.). **The fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research**. 3rd ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2002. p. 251-286.

GARCÍA-NONELL, C.; RATERA, E. R.; HARRIS, S.; HESSL, D.; OMO, M. Y.; TARTAGLIA, N.; MARVIN, E.; TASSONE, F.; HAGERMAN, R. J. Secondary medical diagnosis in fragile X syndrome with and without autism spectrum disorder. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 146, n. 15, p. 1911-1916, Aug. 2008.

GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. **Chromosome abnormalities and genetic counseling**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2004. p. 218-232.

HADDAD, L. A.; MINGRONI NETTO, R. C.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PENA, S. D. J. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. **Hum. Genet.**, v. 97, n. 6, p. 808-812, June 1996.

HAGERMAN, P. J. The fragile X prevalence paradox. **J. Med. Genet.**, v. 45, n. 8, p. 498-499, Aug. 2008.

HAGERMAN, P. J.; HAGERMAN, R. J. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 10, n. 1, p. 25-30, Feb. 2004.

HAGERMAN, R. J. Physical and behavioral phenotype. In: HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. (Ed.). **Fragile X syndrome: diagnosis treatment and research**. 3rd ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2002. p. 3-109.

HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 3, p. 278-283, June 2002.

HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. Testing for fragile X gene mutations throughout the life span. **JAMA**, v. 300, n. 20, p. 2419-2421, Nov. 2008.

HAGERMAN, R. J.; RIVERA, S. M.; HAGERMAN, P. J. The fragile X family of disorders: a model for autism and targeted treatments. **Curr. Pediatr. Rev.**, v. 4, n. 1, p. 40-52, June 2008.

HAGERMAN, R. J.; WILSON, P.; STALEY, L. W.; LANG, K. A. Evaluation of school children at risk for fragile X syndrome utilizing buccal cell *FMR1* -testing. **Am. J. Med. Genet.**, v. 51, p. 474-481, July 1994.

HAGERMAN, R. J.; BERRY-KRAVIS, E.; KAUFMANN, W. E.; ONO, M. Y.; TARTAGLIA, N.; LACHIEWICZ, A.; KRONK, R.; DELAHUNTY, C.; HESSL, D.; VISOOTSAK, J.; PICKER, J.; GANE, L.; TRANFAGLIA, M. Advances in the treatment of fragile X syndrome. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 378-390, Jan. 2009.

HAGERMAN, R. J.; LEAVITT, B. R.; FARZIN, F.; JACQUEMONT, S.; GRECO, C. M.; BRUNBERG, J. A.; TASSONE, F.; HESSL, D.; HARRIS, S. W.; ZHANG, L.; JARDINI, T.; GANE, L. W.; FERRANTI, J.; RUIZ, L.; LEEHEY, M. A.; GRIGSBY, J.; HAGERMAN, P. J. Fragile X associated tremor / ataxia syndrome (FXTAS) in females with the *FMR1* premutation. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 74, n. 5, p. 1051-1056, May 2004.

HALTON, D. D.; SIDERIS, J.; SKINNER, M.; MANKOWSKI, J.; BAILEY, D. B. Jr.; ROBERTS, J.; MIRRETT, P. Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 140, n. 17, p. 1804-1813, Sept. 2006.

HAMDAN, H.; TYNAN, J. A.; FENQICK, R. A.; LEON, J. A. Automated detection of trinucleotide repeats in fragile X syndrome. **Mol. Diag.**, v. 2, n. 4, p. 259-269, Dec. 1997.

HARRIS, S. W.; HESSL, D.; GOODLIN-JONES, B.; FERRANTI, J.; BACALMAN, S.; BARBATO, I.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. J.; HERMAN, H.; HAGERMAN, R. J. Autism profiles of males with fragile X syndrome. **Am. J. Ment. Retard.**, v. 113, n. 6, p. 427-438, Nov. 2008.

HECIMOVIĆ, S.; VLASIC, J.; BARISIC, I.; MARKOVIC, D.; CULIC, V.; PAVELIC, K. A simple and rapid analysis of triplets repeats diseases by expand long PCR. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 39, n. 12, p. 1259-1262, Oct. 2001.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome. Res.**, v. 6, n. 10, p. 986-994, Oct. 1996.

HEITZ, D.; DEVYS, D.; IMBERT, G.; KRETZ, C.; MANDEL, J. L. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. **J. Med. Genet.**, v. 29, n. 11, p. 794-801, Nov. 1992.

HESSL, D.; GLASER, B.; DYER-FRIEDMAN, J.; BLASEY, C.; HASTIE, T.; GUNNAR, M.; REISS, A. L. Cortisol and behavior in fragile X syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 7, p. 855-872, Oct. 2002.

HOLDEN, J. J. A.; CHALIFOUX, M.; WING, M.; JULIEN-INALSINGH, C.; WHITE, B. N. A rapid, reliable, and inexpensive method for detection of di- and trinucleotide repeat markers and disease loci from dried blood spots. **Am. J. Med. Genet.**, v. 64, p. 313-318, Aug. 1996.

HOUDAYER, C.; LEMONNIER, A.; GERARD, M.; CHAUVE, C.; TREDANO, M.; DE VILLEMEUR, T. B.; AYMARD, P.; BONNEFONT, J.-P.; FELDMANN, D. Improved fluorescent PCR-based assay for sizing CGG repeats at the FRAXA locus. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 37, n. 4, p. 397-402, Jan. 1999.

HUNDSCHIED, R. D. L.; SISTERMANS, E. A.; THOMAS, C. M. G.; BRAAT, D. D. M.; STRAATMAN, H.; KIEMENET, L. A. L. M.; OOSTRA, B. A.; SMITS, A. P. T. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X permutations. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 66, n. 2, p. 413-418, Feb. 2000.

JACQUEMONT, S.; HAGERMAN, R. J.; LEEHEY, M.; GRIGSBY, J.; ZHANG, L.; BRUNBERG, J. A.; GRECO, C.; PORTES, V. D.; JARDINI, T.; LEVINE, R.; BERRY-KRAVIS, E.; BROWN, W. T.; SCHAEFFER, S.; KISSEL, J.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P. J. Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 72, n. 4, p. 869-878, Apr. 2003.

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

JIN, P.; WARREN, S. T. New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. **Trends. Biochem. Sci.** v. 28, n. 3, p. 152-158, Mar. 2003.

JOHN HOPKINS UNIVERSITY. **Fragile X mental retardation syndrome**: (300624). Baltimore. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 26 maio 2008.

JOHN HOPKINS UNIVERSITY. **FMR1 Gene; FMR1** : (309550). Baltimore. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 26 maio 2008.

KAU, A. S. M.; TIERNEY, E.; BUKELIS, I.; STUMP, M. H.; KATES, W. R.; TRESCHER, W. H.; KAUFFMANN, W. E. Social behavior profile in young males with fragile X syndrome: characteristics and specificity. **Am. J. Med. Genet.**, v. 126, p. 9-17, Apr. 2004.

KAUFMANN, W. E.; CORTELL, R.; KAU, A. S.; BUKELIS, I.; TIERNEY, E.; GRAY, R. M.; COX, C.; CAPONE, G. T.; STANARD, P. Autism spectrum disorders in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. **Am. J. Med. Genet.**, v. 129, n. 3, p. 225-234, Sept. 2004.

KIRCHGESSNER, C. U.; WARREN, S. T.; WILLARD, H. F. X Inactivation of the *FMR1* fragile X mental retardation gene. **J. Med. Genet.**, v. 32, n. 12, p. 925-929, Dec. 1995.

LACHIEWICZ, A. M.; DAWSON, D. V. Do young boys with fragile X syndrome have macroorchidism? **Pediatrics**, v. 93, n. 1, p. 992-995, June 1994.

LAGGERBAUER, B.; OSTARECK, D.; KEIDEL, E. M.; OSTARECK-LEDERER, A.; FISCHER, U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, p. 329-338, Feb. 2001.

LEWIS, P.; ABBEDUTO, L.; MURPHY, M.; RICHMOND, E.; GILES, N.; BRUNO, L.; SCHROEDER, S. Cognitive, language and social-cognitive skills of individuals with fragile X syndrome with and without autism. **J. Intellect. Disabil. Res.**, v. 50, n. 7, p. 532-545, July 2006.

LOESCH, D. Z.; HUGGINS, R. M.; HAGERMAN, R. J. Phenotypic variation and FMRP levels in fragile X. **Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.**, v. 10, n. 1, p. 31-41, Feb. 2004.

LUBS, H. A. Jr. A marker X chromosome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 21 p. 31-244, May 1969.

LUO, Y.; SHAN, G.; GUO, W.; SMRT, R. D.; JOHNSON, E. B.; LI, X.; PFEIFFER, R. L.; SZULWACH, K. E.; DUAN, R.; BARKHO, B. Z.; LI, W.; LIU, C.; JIN, P.; ZHAO, X. Fragile X mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem / progenitor cells. **Plos. Genet.**, v. 6, n. 4, p. 3-15, Apr. 2010.

MADDALENA, A.; RICHARDS, C. S.; MCGINNISS, M. J.; BROTHMAN, A.; DESNICK, R. J.; GRIER, R. E.; HIRSCH, B.; JACKY, P.; McDOWELL, G. A.; POPOVICH, B.; WATSON, M.; WOLFF, D. J. Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality assurance subcommittee of the Laboratory Practice Committee. **Genet. Med.**, v. 3, n. 3, p. 200-205, May-June 2001.

MARTIN, J.; BELL, J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. **Arch. Neurol. Psychiat.**, v. 6, p. 154-157, 1943.

McCONKIE-ROSELL, A.; ROBINSON, H.; WAKE, S.; STALEY, L. W.; HELLER, K.; CRONISTER, A. Dissemination of genetic risk information to relatives in the fragile X syndrome: guidelines for genetic counselors. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 59, n. 4, p. 426- 430, Dec. 1995.

McCONKIE-ROSELL, A.; ABRAMS, L.; FINUCANE, B.; CRONISTER, A.; GANE, L. W.; COFFEY S. M.; SHERMAN, S.; NELSON, L. M.; BERRY-KRAVIS, E.; HESSL, D.; CHIU, S.; STREET, N.; VATAVE, A.; HAGERMAN, R. J. Recommendations from multi-disciplinary focus groups on cascade testing and genetic counseling for fragile X-associated disorders. **J. Genet. Couns.**, v. 16, n.5, p. 593-606, Oct. 2007.

MINGRONI NETO, R. C.; HADDAD, L. A.; VIANNA-MORGANTE, A. M. The number of CGG repeats of the *FMR1* locus in permuted and fully mutated heterozygote and their offspring: implications for the origin of mosaicism. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 64, p. 270-273, Aug. 1996.

MITCHELL, R. J.; HOLDEN, J. J.; ZHANG, C.; CURLIS, Y.; SLATER, H. R.; BURGESS, T.; KIRKBY, C.; CARMICHAEL, A.; HEADING, K. D.; LOESCH, D. Z. *FMR1* alleles in Tasmania: a screening study of the special educational needs population. **Clin. Genet.**, v. 67, n. 1, p. 38-46, Jan. 2004.

MIYASHIRO, K. Y.; BECKEL-MITCHENER, A.; BECKER, K. G.; BARRET, T.; LIU, L.; CARBONETTO, S.; WEILER, I. J.; GREENOUGH W. T.; EBERWINE, J. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *FMR1* null mice. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 417-431, Feb. 2003.

MUSUMECI, S. A.; HAGERMAN, R. J.; FERRI, R.; BOSCO, P.; DALLA BERNARDINA, B.; TASSINARI, C. A.; DE SARRO, G. B.; ELIA, M. Epilepsy and EEG findings in males with fragile X syndrome. **Epilepsy**, v. 40, n. 8, p. 1092-1099, Aug. 1999.

NATIONAL CENTER BIOTHECNOLOGY INFORMATION. ***FMR1* fragile X mental retardation 1. (L29074)**. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>>. Acesso em: 26 jun. 2010.

NELSON, D. L. The fragile X mental retardation syndrome. In: SHAW, D. J. **Molecular genetics of human inherited disease**. Chichester: John Wiley and Sons, 1995. p. 91-116.

NOLIN, S. L.; BROWN, W. T.; GLICKSMAN, A.; HOUCK, G. E. Jr.; GARGANO, A. D.; SULLIVAN, A.; BIANCALANA, V.; NIELSEN, K. B.; HJALGRIM, H.; FEDER, E. H.; KOOY, F.; LONGSHORE, J.; MACPHERSON, J.; MANDEL, J. L.; MATTHIJS, G.; ROUSSEAU, F.; STEINBACH, P.; VAISANEN, M. L.; KOSKULL, H. V.; SHERMAN, S. L. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 72, p. 454-464, Jan. 2003.

OBERLÉ, I.; ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; KRETZ, C.; DEVYS, D. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science**, v. 252, p. 1097-1102, May 1991.

OOSTRA, B. A.; WILLEMSSEN, R. A gene with three faces. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1790, n. 6, p. 467-477, June 2009.

PANAGOPOULOS, I.; LASSEN, C.; KRISTOFFERSSON, U.; AMAN, P. A methylation PCR approach for detection of fragile X syndrome. **Hum. Mutat.**, v. 14, n. 1, p. 71-79, July 1999.

PLOMIN, R.; DEFRIED, J. C.; MCCLEARN, G. E.; MCGUFFIN, P. **Behavioral genetics**. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2001.

QUEIROZ, M. A. **Avaliação de pré-mutação por PCR na síndrome do cromossomo X frágil**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

REISS, A. L.; HALL, S. S. Fragile X syndrome: assessment and treatment implications. **Child. Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.**, v. 16, n. 3, p. 663-675, July 2007.

REYNIERS, E.; VITS, L.; DE BOULLE, K.; VAN ROY, B.; VAN VELZEN, D.; DE GRAAFF, E.; VERKERK, A. J. M. H.; JORENS, H. Z. J.; DARBY, J. K.; OOSTRA, B.; WILLEMS, P. J. The full mutation in the *FMR1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm. **Nature. Genet.**, v. 4, p. 143-148, June 1993.

ROBERTS, J. E.; BOCCIA, M. L.; HALTON, D. D.; SKINNER, M. L.; SIDERIS, J. Temperament and vocal tone in boys with fragile X syndrome. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 27, n. 3, p. 193-201, June 2006.

ROBERTS, J. E.; WEISENFELD, L. A.; HATTON, D. D.; HEATH, M.; KAUFMANN, W. E. Social approach and autistic behavior in children with fragile X syndrome. **J. Autism. Dev. Disord.**, v. 37, n. 9, p. 1748-1760, Oct. 2007.

ROBERTS, J. E.; SCHAAF, J. M.; SKINNER, M.; WHEELER, A.; HOOPER, S.; HATTON, D. D.; BAILEY, D. B. Jr. Academic skills of boys with fragile X syndrome: profiles and predictors. **Am. J. Ment. Retard.**, v. 110, n. 2, p. 107-120, Mar. 2005.

RODRIGUEIRO, D. A. **Síndrome do cromossomo X frágil**: análise intrafamiliar das características clínicas, psicológicas, fonoaudiológicas e moleculares. 2006. 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ROGERS, S. J.; WEHNER, E. A.; HAGERMAN, R. J. The behavioral phenotype in fragile X: syndrome of autism in very young children with fragile X syndrome, idiopathic autism, and other developmental disorders. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, v. 22, n. 6, p. 409-417, Dec. 2001.

ROUSSEAU, F.; ROUILLARD, P.; MOREL, M. L.; KHANDJIAN, E. W.; MORGAN, K. Prevalence of carriers of premutation – size alleles of the *FMR1* gene – and implication for the population genetics of the fragile X syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 57, p. 1006-1018, Nov. 1995.

ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; BIANCALANA, V.; BLUMENFELD, S.; KRETZ, C.; BOUÉ, J.; TOMMERUP, N.; HAGEN, C. V. D.; DELOZIER-BLANCHET, C.; CROQUETTE, M. F.; GILGENKRANTZ, S.; JALBERT, P.; VOELCKEL, M. A.; OBERLÉ, I.; MANDEL, J. F. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 24, p. 1673-1681, Dec. 1991.

ROSALES-REYNOSO, M. A.; VILATELA, E. A.; OJEDA, R. M.; RIVAS, A. A.; SANDOVAL, L.; SANROMAN, R. T.; BARROS-NÚÑEZ, P. PCR approach for detection of fragile X syndrome and huntington disease based on modified DNA: limits and utility. **Genet. Test.**, v. 11, n. 2, p. 153-159, June 2007.

SABBATINI, R. M. E. Um programa para cálculo da acurácia, especificidade e sensibilidade de testes médicos. **Rev. Inform.**, v. 2, n. 12, p. 19-21, Jan. 1995.

SALUTO, A.; BRUSSINO, A.; TASSONE, F.; ARDUINO, C.; CAGNOLI, C.; PAPPI, P.; HAGERMAN, P.; MIGONE, N.; BRUSCO, A. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the *Fragile X Mental Retardation 1* Gene. **J. Mol. Diagn.**, v. 7, n. 5, p. 605-612, Nov. 2005.

SAUL, R. A.; TARLETON, J. C. *FMR1* -related disorders. **GeneReviews**. Seattle: University of Washington, 2010.

SCHNEIDER, A.; HAGERMAN, R. J.; HESSL, D. Fragile X syndrome – from genes to cognition. **Deve. Disabil. Res. Revi.**, v. 15, p. 333-342, Sept. 2009.

SHERMAN, S. L. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 97, n. 3, p. 189-194, Jan. 2000.

SHERMAN, S. L.; MORTON, N. E.; JACOBS, P. A. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. **Ann. Hum. Genet.**, v. 48, n. 1, p. 21-37, Jan. 1984.

SIOMI, M. C.; SIOMI, M. C.; NUSSBAUM, R. L.; DREYFUSS, G. The protein product of the fragile X gene, *FMR1*, has characteristics of an RNA-binding protein. **Cell**, v. 74, p. 291-298, July 1993.

SKINNER, M.; HOOPER, S.; HATTON, D. D.; ROBERTS, J.; MIRRETT, P.; SCHAAF, J.; SULLIVAN, K.; WHEELER, A.; BAILEY, D. B. Jr. Mapping nonverbal IQ in young boys with fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 132, n. 1, p. 25-32, Jan. 2005.

SMITH, K. T.; COFFEE, B.; REINES, D. Occupancy and synergistic activation of the *FMR1* promoter by Nrf-1 and sp 1 *in vivo*. **Hum. Mol. Genet.**, v. 13, n. 15, p. 1611-1621, June 2004.

SOFOCLEOUS, C.; KOLIALEXI, A.; MAVROU, A. Molecular diagnosis of fragile X syndrome. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v. 9, n. 1, p. 23-30, Jan. 2009.

SULLIVAN, A. K.; CRAWFORD, D. C.; SCOTT, E. H.; LESLIE, M. L.; SHERMAN, S. L. Paternally transmitted *FMR1* alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 70, p. 1532-1544, May 2002.

TABOLACCI, E.; POMPONI, M. G.; PIETROBONO, R.; CHIURAZZI, P.; NERI, G. A unique case of reversion to normal size of a maternal premutation *FMR1* allele in a normal boy. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 16, p. 209-214, Feb. 2008.

TAMANINI, F.; WILLEMSSEN, R.; VAN UNEN, L.; BONTEKOE, C.; GALJAARD, H.; OOSTRA, B. A.; HOOGEVEN, A. T. Differential expression of *FMR1*, *FXR1* and *FXR2* proteins in human brain and testis. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, n. 8, p. 1315-1322, Aug. 1997.

TASSONE, F.; PAN, R.; AMIRI, K.; TAYLOR, A. K.; HAGERMAN, P. J. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (*FMR1*) gene in newborn and high-risk populations. **J. Mol. Diagn.**, v. 10, n. 1, p. 43-49, Jan. 2008.

TOLEDANO-ALHADEF, H.; BASEL-VANAGAITE, L.; MAGAL, N.; DAVIDOV, B.; EHRLICH, S.; DRASINOVER, V.; TAUB, S.; HALPERN, G. J.; GINOTT, N.; SHOHAT, M. Fragile X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 69, p. 351-360, Aug. 2001.

TURNER, G.; WEBB, T.; WAKE, S.; ROBINSON, H. Prevalence of fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, v. 64, p. 196-197, Oct. 1996.

VAN DER OUWELAND, A. M. W.; DEELEN, W. H.; KUNST, C. B.; UZIELL, M. L. G.; NELSON, D. L. Loss of mutation at the *FMR1* locus through multiple exchanges between maternal X chromosomes. **Hum. Mol. Genet.**, v. 3, p. 1823-1827, Oct. 1994.

WILLEMSSEN, R.; BONTEKOE, C. J.; SEVERIJNEN, L. A.; OOSTRA, B. A. Timing of the absence of *FMR1* expression in full mutation chorionic villi. **Hum. Genet.**, v. 110, n. 6, p. 601-605, June 2002

WILLEMSSEN, R.; MIENTIES, E.; OOSTRA, B. A. FXTAS: a progressive neurologic syndrome associated with Fragile X premutation. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.**, v. 5, n. 5, p. 405-410, Sept. 2005.

WILLEMSSEN, R.; MOHKAMSING, S.; DE VRIES, B.; DEVYS, D.; VAN DER OUWELAND, A.; MANDEL, J. L.; GALJAARD, H.; OOSTRA, B. A. Rapid antibody test for fragile X syndrome. **Lancet**, v. 345, n. 8958, p. 1147-1148, May 1995.

WILLEMSSEN, R.; SMITS, A.; MOHKAMSING, S.; VAN BEERENDONK, H.; DE HAAN, A.; DE VRIES, B.; VAN DER OUWELAND, A.; SISTERMANS, E.; GALJAARD, H.; OOSTRA, B. A. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. **Hum. Genet.**, v. 99, n. 3, p. 308-311, Mar. 1997.

WITTENBERGER, M. D.; HAGERMAN, R. J.; SHERMAN, S. L.; McCONKIE-ROSSELL, A.; WELT, C. K.; REBAR, R. W.; CORRIGAN, E. C.; SIMPSON, J. L.; NELSON, L. M. The *FMR1* premutation and reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 87, n. 3, p. 456-465, Mar. 2007.

XIE, W.; DOLZHANSKAYA, N.; LAFAUCI, G.; DOBKIN, C.; DENMAN, R. B. Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. **Neurobiol. Dis.**, v. 35, n. 1, p. 52-62, July 2009.

YAN, G. L.; RAMMAL, M.; TRANFAGLIA, M.; BAUCHWITZ R. P. Suppression of two major fragile X syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 7, p. 1053-1066, July 2005.

ZEESMAN, S.; ZWAIGENBAUM, L.; WHELAN, D. T.; HAGERMAN, R. J.; TASSONE, F.; TAYLOR, S. A. Paternal transmission of fragile X syndrome. **Am. J. Med. Genet. A**, v. 129, n. 2, p.184-189, Aug. 2004.

ZHONG, N.; JU, W.; PIETROFESA, J.; WANG, D.; DOBKIN, C.; BROWN, W. T. Fragile X "gray zone" alleles: AGG patterns, expansion risks, and associated haplotypes. **Am. J. Med. Genet.**, v. 64, n. 2, p. 261-265, Aug. 1996.

ZINGEREVICH, C.; GREISS-HESS, L.; LEMONS-CHITWOOD, K.; HARRIS, S. W.; HESSL, D.; COOK, K.; HAGERMAN, R. J. Motor abilities of children diagnosed with fragile X syndrome with and without autism. **J. Intellect. Disabil. Res.**, v. 53, n. 1, p. 11-18, Jan. 2009.

ANEXOS - Esquemas da aplicação da análise da exatidão (acurácia), especificidade e sensibilidade do método de triagem da *PCR*, comparado com o *Southern blot*.

ANEXO A - Esquema da aplicação da análise em todos os 75 indivíduos com resultados conclusivos pela *PCR*.

		Doença		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
Teste	POS	a 72	b 0	a + b = 72
	NEG	c 0	d 3	c + d = 3
TOTAL		a + c = 72	b + d = 3	a + b + c + d = 75

Sensibilidade (S) = $a / (a + c)$ (S) = $72 / (72 + 0)$ (S) = $72 / 72$ (S) = 100%	Especificidade (E) = $d / (b + d)$ (E) = $3 / (0 + 3)$ (E) = $3 / 3$ (E) = 100%
--	---

Acurácia (A) = $a + d / (a + b + c + d)$ (A) = $72 + 3 / (72 + 0 + 0 + 3)$ (A) = $75 / 75$ (A) = 100%

Legenda: **a:** indivíduos que por *Southern blot* (SB) possuem algum alelo para a SXF e que a *PCR* conseguiu diagnosticar (verdadeiros positivos); **b:** indivíduos que por SB não possuem alelos para a SXF, mas que a *PCR* diagnostica algum alelo (falso-positivo); **c:** indivíduos que possuem por SB algum alelo para a SXF e que a *PCR* não diagnosticou nenhum alelo para a SXF (falso-negativo); **d:** indivíduos que por SB não possuem nenhum alelo para a SXF e que a *PCR* não diagnostica nenhum alelo (verdadeiro negativo).

ANEXO B - Esquema da aplicação da análise em indivíduos diagnosticados com alelos PM e NL pela PCR.

		Doença		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
Teste	POS	a 31	b 0	a + b = 31
	NEG	c 4	d 3	c + d = 7
TOTAL		a + c = 35	b + d = 3	a + b + c + d = 38

Sensibilidade (S) = $a / (a + c)$ (S) = $31 / (31+4)$ (S) = $31/35$ (S) = 88,6%	Especificidade (E) = $d / (b + d)$ (E) = $3 / (0+3)$ (E) = $3/3$ (E) = 100%
---	---

Acurácia (A) = $a + d / (a + b + c + d)$ (A) = $31 + 3 / (31 + 0 + 4 + 3)$ (A) = $34/38$ (A) = 89,5%
--

Legenda: **a:** indivíduos que por *Southern blot* (SB) possuem alelo PM para a SXF e que a *PCR* conseguiu diagnosticá-lo (verdadeiros positivos); **b:** indivíduos que por SB não possuem alelo PM para a SXF, mas que por meio da *PCR* há o diagnóstico do alelo PM (falso-positivo); **c:** indivíduos que por SB possuem alelo PM para a SXF e que por *PCR* foi identificado erroneamente como alelo FM (falso-negativo); **d:** indivíduos que não possuem por SB alelo PM para a SXF e que a *PCR* não diagnostica nenhum alelo expandido (verdadeiro negativo).

ANEXO C - Esquema da aplicação da análise em indivíduos diagnosticados com alelos FM e NL pela *PCR*.

		Doença		
		PRESENTE	AUSENTE	TOTAL
Teste	POS	a 37	b 4	a + b = 41
	NEG	c 1	d 3	c + d = 4
TOTAL		a + c = 38	b + d = 7	a + b + c + d = 45

Sensibilidade (S) = $a / (a + c)$ (S) = $37 / (37+1)$ (S) = $37/38$ (S) = 97,4%	Especificidade (E) = $d / (b + d)$ (E) = $3 / (4+3)$ (E) = $3/7$ (E) = 42,9%
---	--

Acurácia (A) = $a + d / (a + b + c + d)$ (A) = $37 + 3 / (37 + 4 + 1 + 3)$ (A) = $40/45$ (A) = 88,9%
--

Legenda: **a:** indivíduos que possuem por *Southern blot* (SB) alelo FM para a SXF e que a *PCR* conseguiu diagnosticá-lo (verdadeiros positivos); **b:** indivíduos que por SB não possuem alelo FM para a SXF, mas que por meio da *PCR* houve o diagnóstico do alelo FM (falso-positivo); **c:** indivíduo que por SB possui alelo FM para a SXF e que a *PCR* não conseguiu diagnosticá-lo (falso-negativo), de forma que por *PCR*, esse paciente foi identificado como sendo portador somente do alelo PM, não identificando o mosaicismo; **d:** indivíduos que não possuem alelo FM para a SXF e que a *PCR* não diagnostica nenhum alelo (verdadeiro negativo).