



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

JORGE FRANK BRAGA FERREIRA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM PORTADORES
DE TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA NA CIDADE DE MANAUS -
AMAZONAS**

MANAUS

2016

JORGE FRANK BRAGA FERREIRA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM PORTADORES
DE TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA NA CIDADE DE MANAUS -
AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, (UEA) como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline da Silva Batista

MANAUS

2016

JORGE FRANK BRAGA FERREIRA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA SÍNDROME DO X-FRÁGIL EM PORTADORES
DE TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA NA CIDADE DE MANAUS -
AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, (UEA) como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline da Silva Batista

Data da aprovação: 29 / 01 / 2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

Universidade do Estado do Amazonas

Prof^a. Dr^a. Joselita Maria Mendes dos Santos

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^a. Dr^a. Maria da Conceição Freitas dos Santos

Universidade do Estado do Amazonas

Ficha Catalográfica

F383i Ferreira, Jorge Frank Braga

Investigação molecular da síndrome do X-Frágil em portadores de transtornos do espectro autista na cidade de Manaus - Amazonas . / Jorge Frank Braga Ferreira -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende

1. FMRI 2. PCR 3. Mutação dinâmica 4. Trinucleotídeo CGG I.
Título.

CDU: 616.89

Ficha catalográfica elaborada por

Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo.

À CAPES, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

Ao Programa De Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (PPGMBT-UEA).

À Prof. MSc. Lucivana Prata de Souza Mourão, pelo suporte financeiro e pela coordenação do projeto.

Aos Prof^{es}. Dr^{es} Cleiton Fantin Rezende e Jacqueline da Silva Batista pela orientação deste trabalho.

Aos meus pais, irmãs, demais parentes e amigos, pelo incentivo moral.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a execução e finalização deste trabalho.

RESUMO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) representa a principal condição genética associada ao desenvolvimento de Transtornos do Espectro Autista (TEA) e de Deficiência Intelectual hereditária. Uma vez que esta síndrome apresenta expressividade variável e alta prevalência em portadores de Transtornos do Espectro Autista, os testes de triagem para a SXF se fazem necessários para todos os indivíduos diagnosticados com TEA e/ou com Deficiência Intelectual, pois a observação de mutações no gene *FMR1* pode levar a novas opções de tratamento do paciente. Neste estudo, foram verificadas a presença e a frequência de mutações dinâmicas no gene *FMR1* de 101 indivíduos diagnosticados com TEA, por meio da análise molecular. Devido à carência de dados epidemiológicos sobre a SXF com a população brasileira e à ausência de estudos já realizados com a população do Estado do Amazonas, este trabalho representa uma contribuição sobre a frequência desta síndrome na população deste Estado brasileiro.

Palavras-chave: *FMR1*. PCR. Mutação dinâmica. Trinucleotídeo CGG.

ABSTRACT

Fragile X Syndrome (FXS) is the main genetic condition associated to the development of Autism Spectrum Disorders (ASD) and hereditary Intellectual Deficiency (ID). Due to the variable expressivity of this syndrome and to its high prevalence among ASD patients, requiring screening tests for FXS is important for all individuals diagnosed with ASD and/or ID, because the presence of mutations in the *FMR1* gene could lead to new options of treatment for the patient. In this study, the presence and the frequency of dynamic mutations in the *FMR1* gene of 101 ASD patients has been verified by molecular analysis. There are few epidemiological data about the frequency of FXS in the Brazilian population and no study has already been performed in the State of Amazonas, so, this work provides a contribution to the prevalence of this syndrome in this Brazilian state.

Keywords: *FMR1*. *PCR*. Dynamic mutation. CGG trinucleotide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagens do cromossomo X metafásico apresentando sítio frágil	16
Figura 2.	Morfologia das espinhas dendríticas	21
Figura 3.	Representação esquemática do gene <i>FMR1</i>	22
Figura 4.	Herança recessiva ligada ao cromossomo X	25
Figura 5.	Frequência das classes alélicas	39
Figura 6.	Amplitude e média no número de repetições CGG	40
Figura 7.	Eletroferograma de indivíduo homozigoto	41
Figura 8.	Eletroferograma de indivíduo heterozigoto	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critérios diagnósticos e características comportamentais dos TEA	13
Tabela 2.	Características fenotípicas de pacientes portadores de SXF	18
Tabela 3.	Diferentes tipos de alelos para o gene <i>FMR1</i>	24
Tabela 4.	Estudos sobre a ocorrência de SXF na população brasileira	31
Tabela 5.	Genótipo e respectivo número de indivíduos para cada gênero, de acordo com cada classe alélica.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas.

AGG: trinucleotídeo composto de adenina-guanina-guanina.

CGG: trinucleotídeo composto de citosina-guanina-guanina.

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio.

DI: Deficiência Intelectual.

DSM –V: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition* (Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais, 5ª Edição).

Eamaar: Espaço de Atendimento Multidisciplinar ao Autista Amigo Ruy.

FM: *full mutation*, alelo com mutação completa.

FXPOI: *Fragile X-Associated Premature Ovarian Insufficiency* (Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X-Frágil).

FXTAS: *Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome* (Síndrome do Tremor/Ataxia associado à Síndrome do X-Frágil).

OMIM : *Online Mendelian Inheritance in Man* (banco de dados virtual que apresenta dados mais detalhados sobre todas as doenças genéticas conhecidas)

Pb: pares de bases nitrogenadas.

PCR: *Polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

PM: alelo com pré-mutação.

QI: quociente de inteligência.

SB: *Southern Blotting*, técnica molecular de hibridização.

SXF: Síndrome do X-Frágil.

TEA: Transtornos do Espectro Autista.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	12
2.2 SÍNDROME DO X-FRÁGIL (SXF).....	15
2.2.1 Histórico e Definição.....	15
2.2.2 Características fenotípicas do paciente.....	17
2.2.3 Fisiopatologia da SXF.....	19
2.2.4 O gene FMR1 e as diferentes classes alélicas.....	21
2.2.5 Herança e instabilidade das repetições CGG.....	25
2.2.6 Diagnóstico e Tratamento.....	29
2.2.7 Dados epidemiológicos.....	30
2.2.8 Fenótipos associados à pré-mutação em <i>FMR1</i>	31
3 OBJETIVO GERAL	33
3.1 Objetivos específicos.....	33
CAPÍTULO I	34
4 CONCLUSÃO	47
5 REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a forma mais frequente de Deficiência Intelectual hereditária e também a condição genética de origem monogênica mais comum para os Transtornos do Espectro Autista (TEA). A causa mais observada para a síndrome, além de raras mutações pontuais e deleções, são grandes expansões de uma região microssatélite composta pelo trinucleotídeo CGG na região 5'-UTR do gene *FMR1*, localizado no cromossomo X. Números acima de duzentas repetições geralmente levam ao silenciamento epigenético por hipermetilação no promotor do gene e conseqüentemente à inativação de expressão da proteína *FMRP*, cuja ausência nos neurônios é responsável pelo desenvolvimento de Deficiência Intelectual nos portadores de SXF. Os sintomas clássicos da SXF estão associados à Deficiência Intelectual, a distúrbios comportamentais e psiquiátricos e ainda a anomalias faciais, as quais geralmente se apresentam de forma mais leve nas mulheres.

A comorbidade de Deficiência Intelectual comumente observada em indivíduos portadores de Transtornos do Espectro Autista pode ser indicativa da presença de SXF. Devido a isso e também à alta prevalência de TEA em portadores de SXF, a análise molecular do gene *FMR1* nesses indivíduos se faz importante e necessária, pois a observação de mutações neste gene pode levar a novas opções de tratamento do paciente.

Uma vez que não há trabalhos publicados para a detecção de mutações em alelos do gene *FMR1* em indivíduos da população do Amazonas, este trabalho teve como objetivo fazer a investigação molecular de mutações no gene *FMR1*, verificando a prevalência da Síndrome do X-Frágil em indivíduos portadores de Transtornos do Espectro Autista assistidos por duas instituições multidisciplinares da cidade de Manaus, Amazonas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA) representam uma nova denominação para referência a quatro distúrbios do neurodesenvolvimento antes diagnosticados separadamente: o autismo clássico, a síndrome de Asperger, os distúrbios desintegrativos infantis e os distúrbios pervasivos do desenvolvimento não especificados (LAI et al., 2014). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM-5, 2014), o qual mantém posição de referência na classificação de transtornos mentais, indivíduos que haviam recebido diagnóstico para cada um dos quatro distúrbios anteriormente citados devem então, a partir da publicação da 5ª edição deste manual, receber o diagnóstico de TEA.

Na 4ª edição do DSM (DSM-4), o autismo clássico, assim como as outras três condições do neurodesenvolvimento, eram definidos por uma tríade de características: (1) dificuldades de comunicação e interação sociais; (2) comportamentos restritos e repetitivos; e (3) desenvolvimento atípico da linguagem. Com a publicação do DSM-5 (2014), houve redução para uma díade, tendo sido o desenvolvimento atípico da linguagem retirado dos critérios diagnósticos. Esta característica, apesar de ter ampla presença em portadores de TEA e de historicamente conduzir ao diagnóstico de autismo, agora é considerada apenas como uma condição comórbida ou, concomitante (LAI et al., 2014).

Os TEA, portanto, compreendem um amplo grupo de condições que afetam o neurodesenvolvimento, caracterizadas por dois critérios: (A) deficiências severas na comunicação e interação sociais e (B) presença de comportamentos estereotipados e repetitivos (LIU e TAKUMI, 2014). A Tabela 1 abaixo lista alguns exemplos específicos dos critérios A e B para o diagnóstico de TEA, constantes no DSM-5 (2014).

Tabela 1. Critérios diagnósticos e características comportamentais dos TEA (DSM-5, 2014).

Critérios diagnósticos	Características específicas
<p>Critério A: déficits persistentes na comunicação e interação sociais</p>	<p>Déficits na reciprocidade socioemocional; dificuldades em manter uma conversa normal; comunicação verbal e não verbal pouco integrada à normalidade; ausência parcial ou total de expressão facial;</p> <p>Dificuldades para desenvolver, manter e compreender relacionamentos; dificuldades em fazer amigos, dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas, etc.</p>
<p>Critério B: padrões restritos e repetitivos de comportamentos, atividades e interesses.</p>	<p>Movimentos motores; uso de objetos ou fala estereotipados; insistência nas mesmas coisas; adesão inflexível a rotinas; sofrimento extremo em relação a pequenas mudanças;</p> <p>Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente</p>

O diagnóstico de TEA é geralmente realizado por pediatras, neuropediatras, neurologistas, psiquiatras, psicólogos e outros especialistas. Segundo a *National X Fragile Foundation, NFXF* (Fundação Americana do X-Frágil), o profissional de saúde pode fornecer o diagnóstico de TEA a um indivíduo após observação de seu fenótipo comportamental e de seus padrões de linguagem e comunicação, e também, pode fazê-lo baseando-se nos critérios de avaliação contidos no DSM-5 (2014). Além disso, outros instrumentos avaliativos como o *Autism Diagnostic Observation Schedule*, 2ª edição (ADOS-2) e o *Autism Diagnostic Interview – Revised* (ADI-R), considerados padrão-ouro devido a sua alta acuracidade, podem ser aplicados no diagnóstico de TEA. A intervenção e apoio aos portadores de TEA devem ser feitos por uma equipe

multidisciplinar (neuropediatras, neurologistas, psicólogos, pedagogos, fonoaudiólogos, etc) e, se necessário, com a prescrição de fármacos para amenizar sintomas comórbidos como ansiedade, insônia e depressão, não havendo, no entanto, atuação direta sobre os prejuízos na interação social, afirmam Lai et al. (2014).

A prevalência média de TEA na população mundial é 0.62 % (ELSABBAGH et al., 2012), apesar de que alguns estudos em maior escala tenham apresentado dados de 1 a 2% (LAI et al., 2014). Já a prevalência de TEA em indivíduos portadores de Síndrome do X-Frágil varia de 30% a 50% (KAUFFMAN et al., 2004; HAGERMAN e HARRIS, 2008; ABBEDUTO et al., 2014), o que significa dizer que uma alta porcentagem de pacientes afetados pela SXF que preenchem os critérios diagnósticos para os TEA.

Os indivíduos do sexo masculino, de modo geral, são quatro vezes mais afetados que os do sexo feminino (WINARNI et al., 2013), mas os fatores específicos responsáveis pela maior incidência em homens ainda não estão esclarecidos, havendo algumas teorias que buscam explicação para tal fato (BARON-COHEN et al., 2011). A Teoria do cromossomo X associa a maior incidência de TEA em homens ao fato de que o cromossomo X possui mais genes expressos no cérebro do que outros cromossomos (NGUYEN e DISTECHE, 2006). Adiciona-se ainda a esta teoria a observação de que mais de 10% dos indivíduos com déficits de aprendizado apresentam padrões de herança relacionados ao cromossomo X (LAUMONNIER et al., 2007).

A etiologia dos TEA é complexa, envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, bem como a associação de todos eles (ROBERTS et al., 2014). Condições como baixo peso do indivíduo ao nascer, exposição fetal ao ácido valproico, idade parental avançada (DSM-5, 2014; SANDIN et al., 2015) e diferenças significativas de idade entre os genitores (SANDIN et al., 2015) representam fatores ambientais de risco que podem contribuir para o desenvolvimento de TEA em um indivíduo. Os fatores genéticos, sejam eles de origem monogênica ou poligênica, são responsáveis por até 37% dos casos de TEA (DSM-5, 2014). Wheeler et al. (2014) exemplificam algumas condições genéticas relacionadas ao comportamento autista: a Esclerose tuberosa, a Síndrome de Down, a Síndrome de Prader-Willi, a Síndrome

de Angelman, deleções no braço longo do cromossomo 22 (22q) e a Síndrome do X-Frágil. Segundo eles, esta última condição é a mais frequentemente observada em portadores de TEA.

2.2 SÍNDROME DO X-FRÁGIL (SXF)

2.2.1 Histórico e Definição

O atraso ou retardo mental hereditário (termo utilizado na época) ligado ao cromossomo X foi primeiramente descrito em 1943 por J. Purdon Martin e Julia Bell ao analisarem uma família de seis gerações, em que foram encontrados 11 indivíduos do sexo masculino apresentando Deficiência Intelectual (DI). Durante a análise familiar, Martin e Bell (1943) observaram que esta condição neurológica, associada a distúrbios faciais peculiares, apresentava-se em filhos (homens) de mães aparentemente normais, mas não nas filhas destas. A este conjunto de fenótipos neurológicos e dismórficos, com herança ligada ao cromossomo X, deu-se inicialmente o nome de Síndrome de Martin-Bell.

Lubs (1969), ao realizar cultura de leucócitos de quatro homens também apresentando Deficiência Intelectual e características faciais dismórficas, observou que 10% a 30% dessas células apresentavam uma constrição secundária na extremidade distal do braço longo do cromossomo X. Anos mais tarde, a localização mais precisa desta constrição foi identificada em Xq27.3 por Sutherland (1977), e esta região similar a uma falha ou quebra passou a ser conhecida como “sítio frágil” (MARTINS, 2014) (Figura 1).

Sítio frágil no cromossomo X

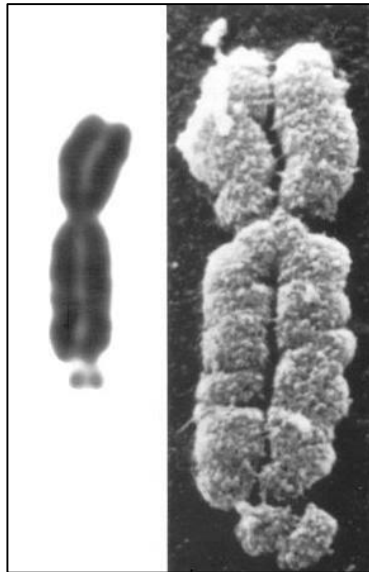


Figura 1. Imagens do cromossomo X metafásico apresentando sítio frágil na extremidade distal do braço longo. Fonte: Gómez (2011)

Até 1980, ainda não haviam sido relacionados os estudos de Martin e Bell em 1943 e os de Lubs em 1969 (MARTINS, 2014). Então no ano de 1991, Verkerk et al. (1991) identificaram e sequenciaram por clonagem posicional o gene denominado *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*) associado à síndrome descrita por Martin e Bell (1943).

A Síndrome de Martin-Bell ou Síndrome de Escalante, atualmente denominada Síndrome do X-Frágil (SXF), é caracterizada como um distúrbio recessivo associado ao cromossomo X, com penetrância reduzida - 80% em homens e 30% em mulheres (JIN e Warren, 2000), com expressividade variável, e pertencente ao grupo de doenças genéticas decorrentes da expansão de repetições instáveis não codificadoras (BAGNI et al., 2012). Esta síndrome é considerada a causa de caráter monogênico mais frequente para os TEA e para a Deficiência Intelectual hereditária (CHOI et al., 2015).

2.2.2 Características fenotípicas do paciente

A caracterização do fenótipo da SXF (dificuldades na linguagem, comportamento repetitivo e contato visual reduzido) apresenta grande similaridade com aquele observado em portadores de TEA, tendo sido tal fato o que primeiramente motivou as pesquisas sobre a compreensão da relação entre estas duas condições patológicas (MEGUID et al., 2014). Um indivíduo pode ser portador de SXF ou de TEA isoladamente, ou ainda, apresentar ambas as condições concomitantemente, conforme Winarni et al. (2013). Quanto a esta última situação, Wheeler et al. (2014) afirmam que crianças que manifestam as duas patologias em comorbidade têm as habilidades social e comunicativa geralmente menos desenvolvidas, os distúrbios de comportamento são mais graves e o déficit cognitivo é mais acentuado do que indivíduos com TEA ou SXF isoladamente.

Os principais grupos sintomáticos observados em portadores da SXF são a Deficiência Intelectual (DI), distúrbios comportamentais e psiquiátricos e ainda dismorfias anatômicas (Tabela 2). As características morfológicas, segundo Garber et al. (2008), apresentam-se de forma sutil e podem muitas vezes não ser óbvias. Orelhas externas evertidas e de baixa implantação, as quais representam a característica morfológica mais comum, podem estar ausentes em até 25% dos afetados (MARTINS, 2014). Outros traços fenotípicos, como prognatismo e o macrorquidismo, só se tornam evidentes após a puberdade, afirmam Heulens et al. (2013). Mandel e Biancalana (2004) acrescentam ainda que, devido ao fato de tais características não se manifestarem de maneira constante ou específica, nem sempre pode-se afirmar ou excluir o diagnóstico de SXF baseando-se unicamente na análise clínica do paciente.

O quadro fenotípico dos portadores da SXF difere entre os gêneros masculino e feminino. Sendo a SXF uma condição ligada ao cromossomo X, mulheres geralmente apresentam características comportamentais e morfológicas mais leves, uma vez que apresentam um segundo cromossomo X normal (GARBER et al., 2008). Segundo Bagni et al. (2012), homens afetados podem apresentar quadro clínico bastante variado, com graus moderado a severo. Já quanto a mulheres afetadas, a maioria apresenta índices de QI na faixa da normalidade, apesar de que sejam

comuns a dificuldade de aprendizagem e distúrbios emocionais, como depressão e ansiedade (HAGERMAN et al., 2011).

Tabela 2. Características fenotípicas de pacientes portadores de SXF. Fonte (COLLINS et al., 2010; DE ESCH et al., 2014).

Características	Exemplos específicos
Morfologia facial	Face alongada, orelhas externas evertidas, macrocefalia, prognatismo, curvatura anormal do palato
Macrorquidismo pós-puberdade	
Anormalidades do tecido conjuntivo	Hiperextensibilidade das articulações, infecções recorrentes da orelha interna.
Timidez ou pouco contato visual	
Déficit de atenção / hiperatividade	
Dificuldade de comunicação	
Comportamentos repetitivos	Hábito de bater e morder as mãos

Além das características supracitadas, portadores de SXF podem ocasionalmente apresentar outras condições patológicas como estrabismo, hiperextensibilidade articular, *pes planus*, palato alto e arqueado, prolapso da valva mitral, escoliose e hipotonia (DE ESCH et al., 2014). Especialmente durante a infância, pode haver casos recorrentes de otite média e sinusite (HAGERMAN et al., 1987), refluxo gastroesofágico em um terço dos portadores (HAGERMAN, 2002) e ainda, convulsões e quadros epilépticos com uma incidência de 13 a 18% em meninos e 5% em meninas (MUSUMECI et al., 1999).

Dentre todas as características apresentadas por indivíduos SXF, a DI representa a mais acentuada e mais consistente, segundo o DSM-5 (2014). Os termos Deficiência Intelectual e Deficiência do Desenvolvimento Intelectual surgiram respectivamente no DSM-5 (2014) e no CID-11, em substituição ao antigo e depreciativo Retardo Mental, o qual foi constante até a 4ª edição do DSM. De acordo com a Associação Americana de Distúrbios Intelectuais e do Desenvolvimento

(AAIDD, *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*), a DI é definida por (1) significantes limitações de funções cognitivas (como raciocínio, leitura, solução de problemas), por (2) dificuldades no desenvolvimento de comportamentos adaptativos (como atividades sociais e práticas diárias) e pelo (3) início desses sintomas anterior aos dezoito anos de idade do indivíduo. Estes três critérios juntamente com o teste de quociente de inteligência (QI) são utilizados para o complexo diagnóstico de DI. O teste de QI é a principal ferramenta na mensuração da capacidade intelectual de um indivíduo e resultados abaixo ou próximos de 70 são indicativos de limitações cognitivas.

A incidência de DI na população geral é de aproximadamente 3% (TALLANTYRE e ROBERTSON, 2013). Na SXF, a DI está presente em mais de 90% dos casos de homens afetados (HESSL et al., 2009), mas em apenas um terço das mulheres portadoras de FM (BAGNI et al., 2012).

2.2.3 Fisiopatologia da SXF

A principal causa para a SXF é a expansão expressiva de uma região de repetição instável composta pelo trinucleotídeo CGG (citosina-guanina-guanina) localizada na região 5' não traduzida (5'-UTR) do éxon 1 do gene *FMR1* (NOLIN et al., 2014; DE ESCH et al., 2014; MYRICK et al., 2015). Este gene está situado na extremidade distal do braço longo do cromossomo X, em um loco denominado FRAXA, na região Xq27.3.

A expansão da repetição CGG no gene *FMR1* é um tipo de mutação dinâmica que responde por mais de 98% dos casos de SXF (SHERMAN et al., 2005; PEPRAH, 2014). No entanto, há outros tipos de mutações menos frequentes que acometem este gene. Conforme afirmam Sethna et al. (2014), já foram relatados alguns poucos casos de mutações pontuais de sentido trocado (*missense mutations*) e de deleções no gene *FMR1*, ocasionando igualmente a síndrome.

Grandes expansões do trinucleotídeo CGG geralmente são acompanhadas por extensa metilação na citosina da região microsatélite e do promotor do gene, o que

prejudica ou silencia a transcrição do pré-mRNA do gene *FMR1* e consequentemente diminui ou inibe a expressão de uma proteína denominada *FMRP* (*Fragile X-Mental Retardation Protein*) (NUSSBAUM et al., 2008). Essa inibição, segundo Penagarikano et al. (2007), se dá por meio do processo de ligação de grupamentos metil ao promotor do gene, o que impede a ligação de fatores proteicos de transcrição e induz à condensação da cromatina, impedindo a ação da maquinaria transcricional.

A *FMRP* é o produto proteico resultante da tradução do mRNA do gene *FMR1*, sendo expressa em vários tecidos corporais, principalmente no cérebro e nos testículos (NUSSBAUM et al., 2008). Nos neurônios de um indivíduo não afetado, esta proteína é encontrada no corpo celular, nas espinhas dendríticas e ainda nas sinapses (SETHNA et al., 2014). Por meio do bloqueio da montagem ribossômica e da interrupção de ribossomos já em atividade, a *FMRP* age controlando a tradução local de mRNAs específicos (DE ESCH et al., 2014), incluindo o próprio transcrito que lhe dá origem (DARNELL e KLANN, 2013).

Uma vez que possui a capacidade de se ligar a moléculas de mRNA específicas, a *FMRP* regula negativamente a síntese de proteínas nos dendritos neuronais (GARBER et al., 2006). Estima-se que aproximadamente 4% de todo o RNA transcrito nas células cerebrais sejam regulados por meio da ligação deste ácido ribonucleico à *FMRP* (LIPTON e SAHIN, 2013), sendo que muitos desses RNA estão envolvidos em funções sinápticas, na sinalização celular e no desenvolvimento neuronal (SETHNA et al., 2014). Com isso, segundo Garber et al. (2008), a diminuição ou total ausência dos níveis de expressão da *FMRP* resultam respectivamente em menor regulação traducional de RNAs-alvo e na falta de interação *FMRP*-RNA, havendo, portanto, expressão descontrolada desses transcritos e aumento na concentração de proteínas nos dendritos.

Os dendritos neuronais apresentam estruturas diminutas em suas extremidades chamadas de espinhas dendríticas (Figura 2), cujas principais funções são aumentar a área de contato e a comunicação elétrica entre os neurônios (McLENNAN et al., 2011) e receber *inputs* (sinais elétricos) que chegam ao corpo celular neuronal (MOURÃO e ABRAMOV, 2011). A síntese proteica de *FMRP* nas espinhas dendríticas é essencial para a sua completa maturação e para a realização

de trocas sinápticas de longa duração, o que fortalece o papel desta proteína na plasticidade sináptica (WINARNI et al., 2013; DE ESCH et al., 2014).

Morfologia das espinhas dendríticas

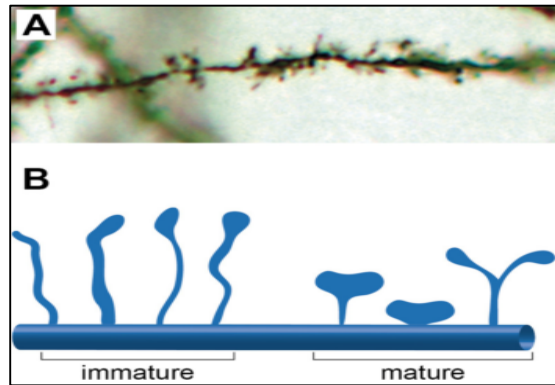


Figura 2. (A) Fotomicrografia apresentando a morfologia das espinhas dendríticas, obtida pelo método de impregnação de Golgi. (B) Representação gráfica da morfologia de espinhas dendríticas com maturação incompleta (esq.) e completa (dir). Fonte: DE ESCH et al. (2014).

A plasticidade sináptica ou neuroplasticidade é definida por Mourão e Abramov (2011) como o processo contínuo em que novas conexões sinápticas são formadas – e as antigas são interrompidas – em resposta a estímulos externos, sendo então este mecanismo vital para funções cerebrais como memória e aprendizado. Uma vez que estas funções são sustentadas pela síntese proteica de *FMRP* nas espinhas dendríticas, a redução ou total ausência de sua expressão estão associadas a sintomas como DI e características autistas em um indivíduo (MCCARY e ROBERTS, 2013). O desequilíbrio entre vias excitatória e inibitória causado pela redução ou ausência de expressão da *FMRP* também acarreta a redução da síntese de serotonina, sendo esta última condição também presente em várias formas de TEA (WINARNI et al., 2013).

2.2.4 O gene *FMR1* e as diferentes classes alélicas

O gene *FMR1* (*Fragile X-Mental Retardation Gene 1*) apresenta extensão de 38kb e está localizado em um loco denominado FRAXA em Xq27.3 (braço longo cromossomo X, região 2, banda 7, sub-banda 3) (MCLENNAN et al., 2011). Seu

mRNA apresenta um comprimento de 4,4kb compostos por 17 éxons (PENAGARIKANO et al., 2007), sendo que o primeiro desses éxons contém uma região microssatélite compostas por trinucleotídeos CGG, localizada entre a ilha CpG na região promotora e a sequência codificadora (ou ORF – *open reading frame*) (Figura 3).

Representação esquemática do gene *FMR1*

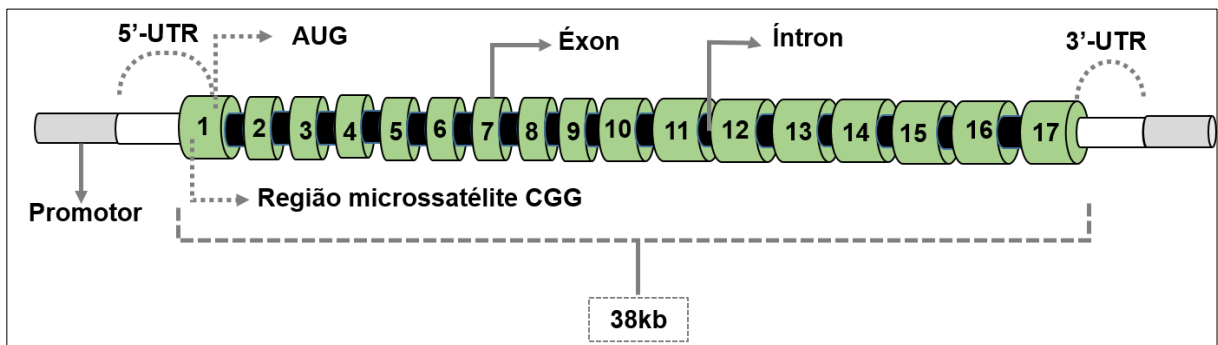


Figura 3. Gene *FMR1* composto de 17 éxons (blocos verdes), intercalados por íntrons (blocos negros). A região microssatélite composta do trinucleotídeo CGG encontra-se na região 5'-UTR do éxon 1, anteriormente ao códon de início de tradução AUG. Fonte: Gómez (2011) com modificações.

O gene *FMR1* pode ser classificado de acordo com o número de repetições CGG que possui e a relação deste número com fatores epidemiológicos. Existem quatro classes alélicas para o gene *FMR1*: (1) alelos normais, (2) alelos intermediários ou *grey zone*, (3) alelos pré-mutados e (4) alelos com mutação completa.

Alelos normais (NM): a primeira classe alélica é representada por indivíduos não afetados. A população normal apresenta polimorfismo para a região microssatélite CGG, cuja quantidade de repetições pode variar de 5 a 44, sendo 29 e 30 os números mais comuns (SETHNA et al., 2014). Geralmente a repetição é herdada de forma estável e apresenta repetições regularmente intercaladas do trinucleotídeo AGG (adenina-guanina-guanina), as quais parecem ter função na manutenção da estabilidade durante a transmissão de uma geração a outra (JIN e WARREN, 2000).

Alelo intermediário (GZ): a classe alélica denominada zona cinzenta, *grey zone* ou ainda zona intermediária é representada por uma faixa que varia de 45 a 54 repetições CGG (FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009). Segundo Bagni et al. (2012), este tipo de alelo apresenta instabilidade meiótica em potencial, sendo possível haver expansão durante transmissão de uma geração a outra, e por conta disso, Nolin et al. (2003) classificam os alelos intermediários como precursores de pré-mutação. Expansões de alelos GZ para alelos FM no período de uma única geração ainda não foram relatadas (CRONISTER et al., 2008).

Alelos com pré-mutação (PM): os alelos pré-mutados são aqueles que apresentam de 55 a 200 repetições CGG no gene *FMR1* (JANG et al., 2014). Alelos contendo esta faixa de repetições geralmente não sofrem a ação de metiltransferases na região promotora, mas são altamente instáveis durante a transmissão de uma geração para a próxima, conforme afirmam SHERMAN et al. (2005). A PM é relativamente comum na população geral, estando presente em aproximadamente 1 entre 130 a 250 mulheres e 1 entre 250 a 810 homens (MEGUID et al., 2014).

Alelos com mutação completa (FM, de *full mutation*): a mutação completa no gene *FMR1* é caracterizada por alelos com expansão superior a 200 repetições CGG (NUSSBAUM et al., 2008), sendo possível encontrar casos com números maiores que 1000 (MANDEL e BIANCALANA, 2004). Em geral, quando há expansão para acima de 200 códon CGGs, ocorre a ação de metiltransferases (metilação) na citosina da região microssatélite e no promotor do gene *FMR1* (DE ESCH et al., 2014). Segundo estes mesmos autores, os mecanismos relacionados à expansão da repetição CGG e ao conseqüente silenciamento transcricional do gene ainda não são totalmente compreendidos.

Tabela 3. Diferentes tipos de alelos para o gene *FMR1* e suas respectivas quantidades de repetições CGG.

Alelos do gene <i>FMR1</i>	Nº de repetições CGG
Normal (NM)	5 a 44
<i>Grey zone</i> (GZ)	45 a 54
Pré-mutado (PM)	55 a 200
Mutação completa (FM)	>200

O polimorfismo para o número de repetições CGG também pode ser observado em células de um mesmo indivíduo ou de um mesmo tecido. Segundo McCary e Roberts (2013), alguns pacientes possuem uma mistura de células em cujo DNA se observam números variados desse trinucleotídeo (mosaicismo de tamanho de repetição), ou ainda, podem apresentar metilação completa ou apenas parcial do gene (mosaicismo de metilação). Mandel e Biancalana (2004) acrescentam que o mosaicismo se apresenta em aproximadamente 15% dos pacientes com SXF, e que tal fenômeno pode ser explicado pela instabilidade somática durante os primeiros estádios da embriogênese.

As diferenças fenotípicas observadas entre diferentes pacientes com SXF são explicadas em parte pela variação residual dos níveis de *FMRP* (JACQUEMONT et al., 2014). Esta variação, conforme estes autores, é determinada pelos padrões de mosaicismo de repetição, de metilação, e ainda, pela inativação aleatória do cromossomo X (em mulheres). Todos os homens mosaicos para o tamanho da repetição e para a metilação são afetados. Já as mulheres mosaicas para estas duas condições vão de normais a totalmente afetadas, uma vez que o fenótipo delas é dependente também do grau de inativação do cromossomo X (NUSSBAUM et al., 2008).

2.2.5 Herança e instabilidade das repetições CGG

A SXF é um distúrbio recessivo que diverge dos padrões tipicamente Mendelianos quanto à herança e às proporções de segregação: o gene *FMR1* é transmitido de mãe para filhos de ambos os sexos, e de pai apenas para filhas, (NUSSBAUM et al., 2008). Estes autores listam abaixo as principais características de uma condição com herança recessiva ligada ao X:

- Os homens são mais comumente afetados do que as mulheres;
- Mulheres heterozigotas geralmente não são afetadas, mas algumas podem expressar a condição com expressividade variável, determinada pelo grau de inativação do cromossomo X;
- Um homem afetado transmite o gene responsável pela condição a todas as suas filhas, as quais serão portadoras, mas não afetadas. O homem nunca transmite o gene responsável para seus filhos homens (Figura 2).
- Mulheres portadoras têm 50% de chance de transmitir a característica para seus filhos (♂) e 50% para suas filhas (♀) (Figura 3).

Herança recessiva ligada ao cromossomo X

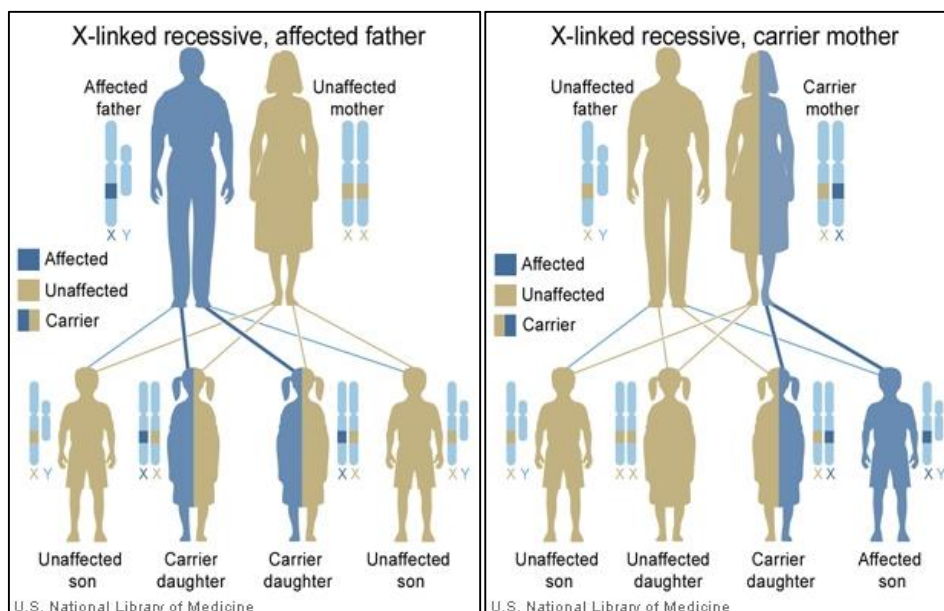


Figura 4. À esquerda, cruzamento entre um homem afetado e uma mulher normal: os filhos homens serão todos não portadores, uma vez que herdam do pai o cromossomo Y. Já as filhas serão apenas portadoras e não afetadas. À direita, cruzamento entre um homem normal e uma mulher portadora, há 50% de chance de que filhos homens sejam afetados e 50% de chance de que as filhas sejam portadoras não afetadas. Fonte: <http://laneccgnetics.pbworks.com>

A SXF foi a primeira condição genética humana decorrente de mutação dinâmica causada por expansão de repetição de trinucleotídeos (JIN e WARREN, 2000). A instabilidade de alelos contendo repetições de nucleotídeos está relacionada a mais de 40 distúrbios neurológicos, neurodegenerativos e neuromusculares (PEARSON et al., 2005). Estes autores afirmam que pode haver mutações durante a transmissão de genitor para prole em todas as doenças decorrentes de expansão de trinucleotídeos. No entanto, a expansão da repetição CGG que ocorre em alelos GZ, PM ou FM ainda não é completamente compreendida. Segundo Cronister et al. (2008), há três fatores principais que podem estar relacionados à expansão da repetição de uma classe alélica para outra: (1) o número de repetições CGG contidos na região microssatélite, (2) a quantidade de sequências AGG (adenina-guanina-guanina) dentro da região microssatélite CGG e (3) o sexo do portador.

O número de repetições CGG em um alelo PM é proporcional à sua instabilidade (NOLIN et al., 2003). Em casos em que o alelo possui mais de 100 repetições desse trinucleotídeo, há 100% de risco de que um alelo materno PM sofra expansão para FM durante a transmissão para a prole (NOLIN et al., 2003; MANDEL e BIANCALANA, 2004). No entanto, em casos raros, também é possível que alelos menores sofram expansão. Em um estudo realizado por Genereux e Laird (2013), observou-se que o menor alelo PM que sofreu expansão para FM tinha apenas 59 repetições. Já Fernandez-Carvajal et al. (2009), em seu trabalho, relataram um caso em que um alelo materno com 56 repetições sofreu expansão para FM em apenas duas gerações.

A região microssatélite CGG do gene *FMR1* possui também sequências intercaladas do trinucleotídeo AGG em alelos normais, sendo por isso classificada por Oliveira et al. (2006) como *imperfeita e não interrompida*, uma vez que ambos CGG e AGG possuem o mesmo motivo de repetição: um trinucleotídeo. Segundo Jang et al. (2014), sequências AGG podem ocorrer regularmente a cada 9 ou 11 repetições CGG $[(CGG)_{9-11}AGG (CGG)_{9-11}AGG(CGG)_n]$ de alelos normais e sua função seria a de promover a estabilidade alélica.

A presença de sequências do trinucleotídeo AGG na região microssatélite CGG está entre as hipóteses mais aceitas para se explicar a ocorrência da expansão

durante a transmissão de genitor para prole. No trabalho de Nolin et al. (2014), mulheres com alelos PM sem sequências AGG apresentaram os maiores riscos de expansão para a FM, enquanto no estudo de Nolin et al. (2003), um alelo materno contendo apenas 59 repetições CGG sem nenhuma sequência intercalada AGG sofreu expansão para FM em uma única geração. Jin e Warren (2000) afirmam que, quando o fragmento de Okazaki formado durante o processo de replicação do DNA é composto por muitas repetições perfeitas CGG, sem nenhum AGG servindo como estabilizador, ocorre a formação de estruturas secundárias denominada *hairpins*. Estas estruturas, segundo eles, seriam responsáveis por fazer com que a DNA polimerase derrapasse durante sua ação revisora, possivelmente ocasionando o aumento de repetições CGG. Hipóteses mais recentes sugerem que a instabilidade alélica não é devida diretamente à ausência do trinucleotídeo AGG, mas sim à extensão de CGGs ininterruptos (MANDEL e BIANCALANA, 2004).

O sexo do portador também apresenta relação com a taxa de expansão da repetição CGG. Alelos PM são meiótica e mitoticamente instáveis e apresentam maior tendência a se expandir durante a gametogênese feminina. Com isso, curiosamente expansões de alelos PM para FM só ocorrem por meio da transmissão materna (FU et al., 1991; JIN e WARREN, 2000). NOLIN et al. (2003) afirmam que, quando um alelo PM é transmitido por uma mãe, ocorre expansão da repetição em quase todos os casos, seja ela dentro dessa mesma classe alélica (PM) ou para a classe seguinte (FM). Uma possível explicação para a expansão de origem materna, segundo Pearson et al. (2005), estaria relacionada ao longo período de processamento da meiose durante a oogênese (com início na vida intrauterina e término apenas durante a fertilização).

Alelos de origem paterna raramente sofrem expansão. Quando o fazem, tais expansões são atribuídas ao grande número de divisões mitóticas durante o processo de gametogênese, afirmam Pearson et al. (2005). Logo, na grande maioria dos casos, alelos PM de origem paterna se mantêm estáveis quando transmitidos para filhas, não havendo, portanto, expansão para FM (JANG et al., 2014). Em alguns casos, já foram observadas contrações da região microssatélite CGG por meio de transmissão paterna. O primeiro caso em que houve esse tipo de contração foi relatado por

Väisänen et al. (1996), quando foi verificada a redução no tamanho de um alelo PM com 130 CGGs transmitido de um pai para sua filha, a qual herdou este alelo contendo apenas 34 repetições. Geralmente, as filhas de um pai portador de alelo PM, denominados NTMs (*normal transmitting males*), não apresentam DI e nem expressão citogenética da mutação, afirma Reyniers (1993), mas possuem alta probabilidade de gerar filhos afetados pela SXF (MANDEL e BIANCALANA, 2004).

A observação de que as filhas de um pai afetado (FM) comumente são não afetadas e o fato de que não são encontradas mutações completas em espermatozoides maduros (REYNIERS, 1993; PEPRAH, 2012) levaram à formulação de duas principais hipóteses para se tentar compreender o modo incomum de transmissão do alelo *FMR1* entre pai e filhas: hipótese pré-zigótica e hipótese pós-zigótica. A hipótese pré-zigótica foi testada em um estudo realizado por Reyniers (1993), quando foi comparado o material genético de ambos linfócitos e espermatozoides de quatro homens afetados pela SXF, e verificou-se que naquele tipo celular havia FM, enquanto neste apenas a PM foi observada. As possíveis explicações para tal condição, segundo o autor, é que durante a espermatogênese, a FM sofre regressão para PM ou ainda, que algum mecanismo fisiológico selecione os espermatozoides com o alelo PM em favor daqueles com FM durante o processo de maturação dos espermatozoides (espermiogênese). Malter et al. (1997) complementam que esta possível seleção de linhagens celulares esteja relacionada à expressão ou não da *FMRP*, ou seja, durante a espermiogênese, linhagens incapazes de expressar esta proteína seriam descartadas ou degradadas. No entanto, estes autores também consideram a hipótese pós-zigótica, segundo a qual há expansão ou contração da região microssatélite nas células germinativas (espermatogônias) em algum momento após a 13ª semana de desenvolvimento embrionário.

Apesar de pouco frequentes, contrações do tamanho da repetição CGG de origem materna também já foram relatadas. Nolin et al. (2003) identificaram em seu estudo a presença de cinco alelos maternos PM ou GZ que sofreram reversão para um alelo menor. Outros autores verificaram ainda a presença da mutação reversa (contração) em que foi observada a mudança de classificação alélica entre mãe e filha. Vits et al. (1994) evidenciaram um alelo de uma mãe com 110 CGGs que reverteu

para 44 na sua filha. Já Gasteiger et al. (2003) apresentaram um caso em que um alelo materno PM com 130 CGGs sofreu deleção durante transmissão para uma prole do sexo feminino, a qual herdou um alelo contendo apenas 10 repetições.

O fenômeno de expansão do tamanho da região microssatélite CGG instável leva a outro fenômeno observado entre as doenças genéticas da categoria de expansão de repetições instáveis, a antecipação genética, a qual é definida por Jorde et al. (2004) como a expressão progressivamente mais precoce ou mais severa das características de uma doença genética, à medida que a condição é transmitida de uma geração para outra.

2.2.6 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da SXF geralmente é feito por volta dos três anos de idade, quando os primeiros sintomas de desenvolvimento e comportamento começam a se apresentar no indivíduo (DE ESCH et al., 2014). Até os anos 90, as técnicas citogenéticas eram majoritárias no diagnóstico da síndrome e consistiam basicamente na verificação da presença do sítio frágil no loco Xq27.3. No entanto, devido a sua baixa sensibilidade, este tipo de análise foi abandonado nos grandes laboratórios (WINARNI et al., 2013). O termo “X Frágil” constante em SXF refere-se ao marcador citogenético FRAXA (sítio frágil, cromossomo X, sítio A) observado na análise do cariótipo de indivíduos afetados. Neste sítio, a cromatina não se condensa durante o empacotamento do cromossomo X na metáfase, formando uma região de constrição na porção distal do braço longo deste cromossomo (JIN e WARREN, 2000).

Atualmente, as técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de hibridização de *Southern Blotting* são as mais utilizadas para a análise de mutações no gene *FMR1* (BAGNI et al., 2012). A transferência de *Southern Blotting* baseia-se, de acordo com a definição de Rousseau et al. (2011), na utilização de enzimas de restrição específicas que digerem o DNA genômico, ao qual se hibridiza uma sonda de DNA também específica. Porém, esta técnica apresenta limitações pelo

fato de sua execução ser complexa e laborosa, por requerer corpo técnico experiente e por levar vários dias para apresentar resultados.

A reação de PCR, devido a sua simplicidade e rapidez, ainda é o método preferido para o diagnóstico molecular da SXF, afirmam Rousseau et al. (2011). No entanto, a amplificação de alelos com quantidade superior a 200 repetições da trinca CGG é bastante dificultosa devido ao alto conteúdo de nucleotídeos citosina e guanina (SALUTO et al., 2005; KHANIANI et al., 2008; ROUSSEAU et al., 2011). As maiores amplificações de grandes alelos do gene *FMR1* por PCR convencional já registradas continham 250 (HAMDAN et al., 1997) e 330 (SALUTO et al., 2005) repetições CGG.

Alguns autores (MANDEL e BIANCALANA, 2004; HAGERMAN et al., 2010) sugerem que os testes de triagem para a SXF sejam efetuados em todos os indivíduos diagnosticados com TEA ou com Deficiência Intelectual, devido a fatores como a alta prevalência de TEA em indivíduos portadores de SXF, à relação etiológica existente entre as duas condições patológicas, e ainda, ao fato de que as características físicas sugestivas para a SXF nem sempre se manifestam de forma evidente durante a infância. Até o momento não há cura efetiva para a síndrome. O tratamento dos sintomas é feito basicamente por fármacos que agem controlando a hiperatividade, a impulsividade, a ansiedade, a agressão e os distúrbios de humor, associados a psicoterapia e à terapia comportamental (DE ESCH et al., 2014).

2.2.7 Dados epidemiológicos

Na população geral, 1 em cada 2500 a 5000 homens é afetado pela SXF, enquanto que nas mulheres a prevalência é de 1 em cada 4000 a 6000 (SETHNA et al., 2014). Já a prevalência da SXF na população de indivíduos com Transtornos do Espectro Autista é de 2% a 6% (HAGERMAN et al., 2010), e de cerca de 10% nos casos de Deficiência Intelectual (DE ESCH et al., 2014).

No Brasil, dados epidemiológicos da SXF são bastante escassos, não tendo sido encontradas estatísticas sobre a incidência desta síndrome na população em sítios de busca eletrônicos oficiais como, por exemplo, o do Ministério da Saúde.

Poucos estudos já foram realizados no país com o objetivo de se verificar a ocorrência da SXF. A tabela 4 apresenta os estudos já realizados com a população brasileira e relaciona o número amostral analisado com os resultados obtidos.

Tabela 4. Estudos sobre a ocorrência de SXF na população brasileira

Autor	Amostra	Prevalência
Amâncio (2013)	35	0
Fristch (2011)	128	8
Gómez (2011)	511	0
Stegani (2011)	33	0
Queiroz (2006)	122	0
Silva (2004)	442	4
Sucharov et al. (1999)	100	0

A SXF parece ter distribuição igualitária a nível mundial, não havendo relação significativa com algum grupo étnico (ROUSSEAU et al., 2011), apesar de que alguns estudos (BUYLE et al., 1993; BONAVENTURE et al., 1998; DE DIEGO et al., 2002) tenham relatado maiores frequências da mutação no gene *FMR1* em algumas populações, possivelmente associados ao efeito do fundador).

2.2.8 Fenótipos associados à pré-mutação em *FMR1*

As consequências clínicas da expansão do microssatélite CGG no gene *FMR1* não estão restritas apenas a indivíduos com a mutação completa. Portadores de alelos PM geralmente não são afetados pelos sintomas clássicos da SXF, mas apresentam risco aumentado de expansão para a FM e também de desenvolvimento de distúrbios secundários associados a esta síndrome (JANG et al., 2014). Entre os distúrbios

associados à PM estão a Síndrome do Tremor/Ataxia associados ao X Frágil (FXTAS) e a Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X-Frágil (FXPOI).

A FXTAS (OMIM #300623) é um distúrbio neurodegenerativo de início tardio que acomete indivíduos portadores de alelos PM, havendo maior predominância em homens (BOURGEOIS et al., 2009). O quadro clínico é caracterizado por distúrbios cinéticos como tremor de intenção e ausência de coordenação nos movimentos dos membros, ataxia cerebelar, perda de memória recente e até mesmo parkinsonismo, de acordo com Hagerman e Hagerman (2015). Estes sintomas parecem estar atribuídos a um fenômeno conhecido como toxicidade do RNA nos neurônios, causado por níveis elevados do transcrito gene *FMR1* geralmente encontrados em portadores de alelos PM (RASKE e HAGERMAN, 2006; LIU et al., 2013).

A penetrância desta síndrome é de 17% em indivíduos na sexta década de vida, 38% na sétima década, 47% na oitava e de 75% em pacientes com mais de oitenta anos, afirmam Nussbaum et al. (2008). Apesar de sua maior prevalência em pacientes com alelos PM, também já foram relatados alguns casos da síndrome em indivíduos com alelos da zona intermediária GZ (HALL et al., 2012; LIU et al., 2013).

A segunda condição patológica associada a alelos PM é denominada Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X-Frágil (FXPOI) (OMIM #311360), com prevalência de aproximadamente 20% das mulheres que possuem alelos PM (BAGNI et al., 2012). A FXPOI é definida como a interrupção da menstruação anterior aos 40 anos de idade, com acentuada diminuição ou total ausência da função ovariana, perda de fertilidade e hipoestrogenismo (PEPRAH, 2014). As primeiras evidências desta síndrome se deram pela observação de que uma grande proporção (~24%) de mulheres mães de filhos afetados pela SXF apresentavam falência ovariana prematura (WOAD et al., 2006). Até o momento, os mecanismos moleculares que desencadeiam a FXPOI não são claramente compreendidos (PEPRAH, 2014).

3 OBJETIVO GERAL

Realizar uma investigação molecular da Síndrome do X-Frágil em indivíduos portadores de Transtornos do Espectro Autista assistidos por duas instituições multidisciplinares da cidade de Manaus, Amazonas.

3.1 Objetivos específicos

- Calcular a frequência de cada classe alélica, a média e o número modal de repetições CGG nos alelos do gene *FMR1* da população estudada;
- Classificar os indivíduos quanto ao número de repetições CGG contidas no alelo do gene *FMR1*;
- Contribuir para o levantamento de dados epidemiológicos sobre a prevalência de SXF no Estado do Amazonas.

CAPÍTULO I

Estudo do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) em uma amostra da população autista de Manaus-AM

Estudo dos alelos do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) em uma amostra da população autista de Manaus-AM

Ferreira, J.F; Fantin, C; Batista, J.S; Mourão, L.S

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazonia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil.

Resumo

A Síndrome do X-Frágil (SXF) representa a principal condição genética associada ao desenvolvimento de Transtornos do Espectro Autista (TEA) e de Deficiência Intelectual hereditária (DI). Uma vez que esta síndrome apresenta expressividade variável e alta prevalência em portadores de Transtornos do Espectro Autista, os testes de triagem para a SXF se fazem necessários para todos os indivíduos diagnosticados com TEA e/ou com Deficiência Intelectual, pois a observação de mutações no gene *FMR1* pode levar a novas opções de tratamento do paciente. Devido à carência de dados epidemiológicos sobre a SXF com a população brasileira e à ausência de estudos já realizados com a população do Estado do Amazonas, este trabalho representa uma contribuição sobre a frequência desta síndrome na população deste Estado brasileiro. Por meio da análise molecular, foi verificada a presença e a frequência de mutações dinâmicas no gene *FMR1* de 101 indivíduos diagnosticados com TEA. Quatro indivíduos apresentaram alelos da zona intermediária e quatro outros, da zona de pré-mutação. Nenhum dos indivíduos estudados apresentou expansão alélica expressiva condizente com a SXF.

Palavras-chave: Síndrome do X-Frágil. Transtornos do Espectro Autista. Análise molecular

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é considerada a causa de caráter monogênico mais frequente para os Transtornos do Espectro Autista (TEA) e para a Deficiência Intelectual hereditária (DI) (CHOI et al., 2015). Esta síndrome, caracterizada por distúrbios comportamentais e cognitivos associados aos TEA e ainda por dismorfias faciais (HEULENS et al., 2013; WINARNI et al., 2013), é causada pela expansão expressiva de uma região de repetição instável composta pelo trinucleotídeo CGG, localizada na região 5'-UTR do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) (NOLIN et al., 2014; DE ESCH et al., 2014; MYRICK et al., 2015). Este tipo de mutação dinâmica responde por mais de 98% dos casos de SXF (SHERMAN et al., 2005; PEPRAH, 2014), levando à hipermetilação do promotor do gene e ao silenciamento transcricional (SETHA et al., 2014), e portanto, impedindo a produção da proteína *FMRP* (*Fragile X Mental Retardation Protein*), cuja ausência está associada a sintomas como DI e características autistas em um indivíduo (MCCARY e ROBERTS, 2013).

Devido à alta prevalência de TEA em indivíduos portadores de SXF, à relação etiológica existente entre estas duas condições patológicas e ao fato de que as características físicas sugestivas para a SXF nem sempre se manifestam de forma evidente durante a infância, alguns autores (MANDEL e BIANCALANA, 2004; HAGERMAN et al., 2010) sugerem que os testes de triagem para a SXF sejam efetuados em todos os indivíduos diagnosticados com TEA e/ou com Deficiência Intelectual, pois a observação de mutações no gene *FMR1* pode levar a novas opções de tratamento do paciente.

Uma vez que não há trabalhos publicados para a detecção de mutações dinâmicas em alelos do gene *FMR1* com a população do Amazonas, este estudo teve como objetivo realizar uma investigação molecular de mutações no gene *FMR1*, verificando a prevalência da Síndrome do X-Frágil em indivíduos portadores de Transtornos do Espectro Autista assistidos por duas instituições multidisciplinares da cidade de Manaus, Amazonas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido ao e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), conforme parecer consubstanciado Nº CEP-UEA 363.912/2013.

O DNA genômico de 87 homens e de 14 mulheres foi analisado para o estudo do polimorfismo do loco FRAXA, localizado na região 5'UTR do gene *FMR1*, cromossomo X. Esta amostra foi composta por indivíduos diagnosticados com TEA com faixa etária variando de 3 a 26 anos, assistidos por duas instituições multidisciplinares da cidade Manaus-Amazonas (Centro de Educação Especial André Vidal de Araújo e Espaço de Atendimento Multidisciplinar ao Autista Amigo Ruy). Também foi incluída na pesquisa uma amostra pertencente a um indivíduo com suspeita clínica de SXF encaminhado ao Laboratório de Proteômica e Genômica da UEA por uma médica geneticista. Todos os pais ou responsáveis legais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), no qual concordaram com a participação voluntária na pesquisa. Células da mucosa jugal de cada indivíduo foram coletadas com o auxílio de um bastão de SWAB e armazenadas em solução de Tris-EDTA (10mM/0.1mM). A extração do DNA foi efetuada pelo método CTAB 2% (DOYLE e DOYLE, 1990) (Anexo II) e quantificado em aparelho *BioSpectrometer* Eppendorf®.

O loco de interesse foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores fluorescentes desenvolvidos por Fu et al. (1991): 5'-*gctcagctccgtttcggtttcacttccggt*-3' e 6-FAM-5'-*agccccgcacttccaccaccagctcctcca*-3'. As amplificações foram efetuadas em aparelho termociclador SimpliAmp™ Applied Biosystems com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5', seguida de 32 ciclos de 94°C por 45", 65°C por 1'30" e 72°C por 2'), e extensão final a 72°C por 10'. O volume total da reação foi 24µL, contendo 2,4µL de tampão de amplificação para *Pfu* DNA polimerase (Biotech Amazonia, Manaus, BRA); 0,85mM de cada dNTP; 0,33µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,63% de DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA); 1,65µM de BSA (*bovine serum albumine acetylated*) (Promega, Madison, WI, EUA); 1U de Platinum *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); e ~60ng de DNA genômico.

A confirmação da reação de amplificação foi feita por submissão à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Foram utilizados ainda, como parâmetros comparativos, dois controles positivos para SXF (gentilmente concedidos pelos Prof^{es}. Dr^{es}. Renata Lúcia Ferreira de Lima - UFBA e José Pereira de Moura Neto - UFAM) e um controle negativo (DNA de indivíduo sabidamente não afetado pela SXF). Os géis foram fotografados em transiluminador UV L-PIX HE.

O tamanho dos alelos foi determinado por meio de eletroforese capilar em aparelho sequenciador automático ABI-3130XL, utilizando o polímero 3130 POP-7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado o marcador interno ROX-1000 pUC-19, ao qual adicionaram-se 1,0µL da reação de PCR e 8,0µL de formamida. A interpretação dos eletroferogramas foi feita por meio do programa *GeneMarker* v.2.6.0. O tamanho esperado para o produto de amplificação foi de 221 pares de bases (pb), excluindo-se a região microssatélite CGG.

Para o cálculo de número de repetições CGG no gene *FMR1*, a seguinte fórmula foi utilizada, desenvolvida por HAMDAN et al. (1997):

$$\text{Nº de CGG} = \frac{(\text{tamanho do alelo em pb}) - (221\text{pb})}{3}$$

Os indivíduos foram classificados quanto ao número de cópias CGG em normal (5-44), *grey-zone* (45-54), pré-mutado (55-200) e com mutação completa (>200) (NUSSBAUM et al., 2008; FERNANDEZ-CARVAJAL et al., 2009; JANG et al., 2014; SETHNA et al., 2014). A frequência das diferentes classes alélicas foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Frequência alélica} = \frac{\text{Nº de indivíduos em cada classé alélica}}{\text{Nº amostral total}}$$

A moda e a média aritmética do número de cópias CGG foram calculadas por meio de programa computacional Excel 2016[®].

3 RESULTADOS

De um total de 101 indivíduos analisados, 85 apresentaram alelos para o gene *FMR1* dentro da classe normal de repetições CGG, 4 apresentaram alelos intermediários, 4 apresentaram alelos pré-mutados e nenhum alelo com mutação completa foi encontrado. A frequência de cada classe alélica é apresentada na Figura 5.

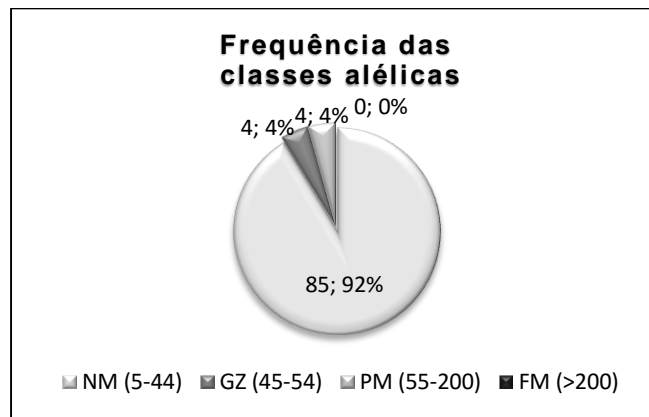


Figura 5. Frequência das classes alélicas para o gene *FMR1*. A frequência de alelos FM foi nula.

O número modal para o quantitativo de repetições CGG foi 27, aparecendo em 26 homens e 2 mulheres (Tabela 5).

Tabela 5. Genótipo e respectivo número de indivíduos para cada gênero, de acordo com cada classe alélica.

Normal NM (5 - 44 CGG)			Grey zone GZ (45-54 CGG)		
(CGG) _n	Homens	Mulheres	(CGG) _n	Homens	Mulheres
	N=73	N=12		N=4	N=0
13	-	1			
16	1		45	1	
17	2	1	47	1	
19	2		49	1	
20	2		53	1	
21	1	1			
25	6	2			
26	19	3			
27*	26	2			
28	5	1			
29	4				
34	1				
38	2				
39	-	1			
40	1				
42	1				
Pré-mutado PM (55-200 CGG)			Mutação completa FM (>200 CGG)		
(CGG) _n	Homens	Mulheres	(CGG) _n	Homens	Mulheres
	N=4	N=0		N=0	N=0
55	1				
68	1				
88	1				
90	1				

A média total do número de repetições CGG observadas nesta população foi de 29. A média e a amplitudes observadas dentro de cada classe alélica estão constantes na Figura 6.

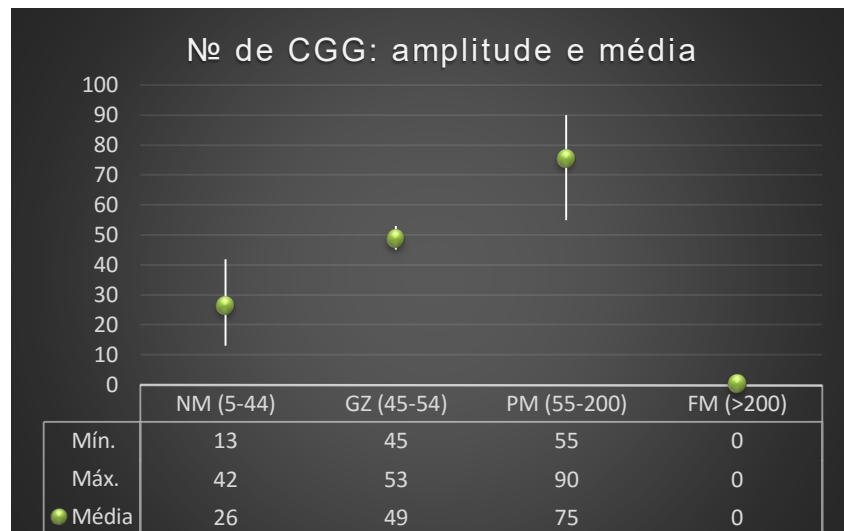


Figura 6. Comparativo da média de repetições CGG dentro de cada classe alélica. A amplitude também pode ser observada, ou seja, o menor e o maior número de repetições observados dentro de cada classe.

Por meio da eletroforese capilar, pôde-se verificar a intensidade dos picos de fluorescência para os alelos do gene *FMR1* (Figura 7). Verificou-se que apenas um dos indivíduos do sexo feminino apresentou heterozigose para o gene *FMR1* (Figuras 7). Os demais indivíduos deste gênero apresentaram resultado inconclusivo, uma vez que não foi possível determinar com exatidão se houve homozigose ou se não houve amplificação do segundo alelo devido a sua grande extensão.

Eletoferograma de indivíduo homozigoto

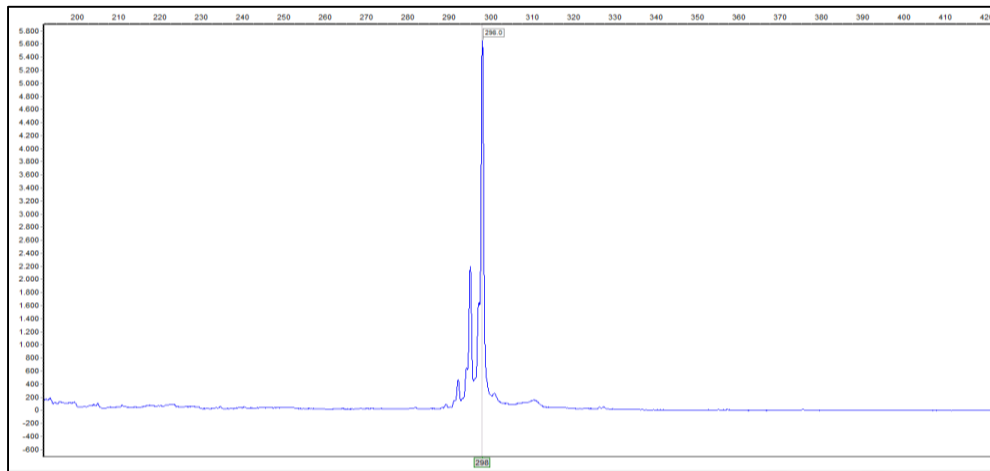


Figura 7. Eletoferograma de indivíduo do sexo masculino, apresentando um único alelo para o gene *FMR1* com 298pb, ou, 26 repetições CGG.

Eletoferograma de indivíduo heterozigoto

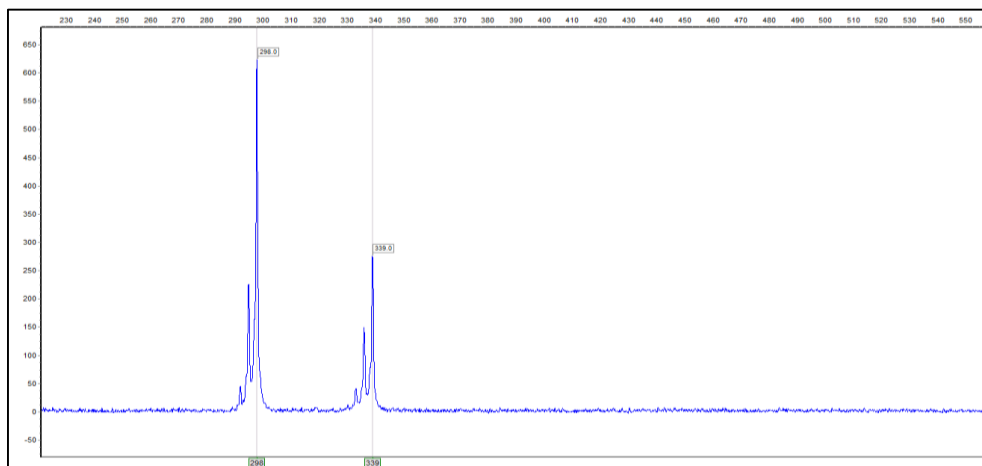


Figura 8. Eletoferograma de indivíduo do sexo feminino, apresentando alelos heterozigotos para o gene *FMR1* com 298 e 339pb, ou, 26 e 39 repetições CGG, respectivamente.

DISCUSSÃO

Este é possivelmente o primeiro estudo verificando a presença de mutações dinâmicas no gene *FMR1* de indivíduos portadores de TEA na cidade de Manaus-

Amazonas. No Brasil, não foram encontrados trabalhos utilizando como critério de inclusão “portador de Transtornos do Espectro Autista” para análise molecular do gene *FMR1*. Neste estudo, não foi realizada triagem clínica para SXF previamente à análise molecular, uma vez que, como já citado anteriormente, as características físicas que seriam sugestivas para a SXF nem sempre se manifestam de forma evidente durante a infância, devido à expressividade variável da síndrome (MANDEL e BIANCALANA, 2004; HAGERMAN et al., 2010).

A classe alélica mais frequente observada nesta população de indivíduos com TEA foi obviamente a de 5 a 44 cópias CGG. Quatro indivíduos apresentaram alelos GZ e outros quatro, alelos PM. Não foram observados alelos com mutação completa, provavelmente devido ao pequeno número amostral. A presença de alelos PM nesta população é um dado que apresenta interesse tanto para médicos geneticistas quando para a família do probando, uma vez que tais alelos apresentam instabilidade meiótica, havendo risco de expansão durante a transmissão materna, e ainda, existe certa probabilidade de desenvolvimento de condições de início tardio relacionadas a pré-mutação, como a FXPOI e a FXTAS.

A média de repetições CGG observada (29) é condizente com o apresentado por outros autores (MADALENA et al., 2001; SETHNA et al., 2014). O número modal observado neste trabalho foi de 27 repetições CGG, aparecendo em 27 de 93 indivíduos. Diferentes trabalhos já realizados com a população brasileira ou com populações de outros países apresentaram variação na frequência alélica, sugerindo que existe uma relação entre esse polimorfismo no tamanho dos alelos e a origem étnica da população estudada. No Brasil, Sucharov et al. (1999), Mingronni-Netto et al. (2002), Silva et al. (2004) e Gómez (2011) encontraram moda de 20 repetições, enquanto Queiroz (2006) observou número bimodal de 28 e 30. Em outros estudos com as populações da Indonésia (FARADZ et al., 2000), China (FARADZ et al., 2000; ZHOU et al., 2006) e México (ROSALES-REYNOSO et al., 2005), foram encontradas frequências alélicas de 29, 29 e 32, respectivamente.

Brown et al. (1993), Chiurazzi et al. (1996) e Kunst et al. (1996) afirmam que alelos contendo de 28 a 30 repetições CGG são mais frequentes na população caucasiana, apesar de que Mingronni-Netto et al. (2002) tenham encontrado na população de São Paulo, a qual possui em sua maioria ancestralidade europeia, valores modais de 20 CGGs. A importância de se calcular a frequência alélica do gene *FMR1* em

determinada população, segundo Peprah (2012), reside no fato de se poder verificar a instabilidade genética no loco FRAXA e de se identificar os possíveis riscos de expansão alélica, o que pode ser de interesse para médicos geneticistas e para portadores de alelos pré-mutados com risco de expansão para mutação completa.

Outros estudos já realizados no país utilizaram critérios diversos para a observação da prevalência de SXF. Sucharov et al. (1999), Silva (2004) e Gómez (2011) estudaram o DNA de pacientes da população normal e encontraram respectivamente 0%, 0,09% e 0% de prevalência de SXF. Queiroz (2006), Stegani (2011) e Amâncio (2013) utilizaram como critério de inclusão a suspeita clínica para SXF, mas não foram encontrados indivíduos portadores de mutação completa no gene *FMR1*. Fristch (2011) fez análise molecular de pacientes com Deficiência Intelectual e observou 8 pacientes com mutação dinâmica relativa à SXF.

A técnica de amplificação por reação em cadeia da polimerase se mostrou difícil neste estudo. Foram realizados testes com diferentes enzimas polimerases - *Taq* DNA polimerase (Biotech Amazonia, Manaus, BRA), *OneTaq* DNA polimerase (New England Biolabs), *Pfu* DNA polimerase (Biotech Amazonia, Manaus, BRA), HotStart *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec) e *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

4 REFERÊNCIAS

AMÂNCIO, Andrea Pires. **Análise molecular de pacientes com suspeita da síndrome do X-Frágil**. 2013. 75p. Dissertação (Mestrado em Genética – Pontifícia Universidade Católica de Goiás), Goiânia, Goiás, 2013.

BROWN, W.T. et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. **Journal of the American Medical Association**, v. 270, p.1569-1575, 1993.

CHIURAZZI, P. et al. Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. **American Journal of Medical Genetics**, v.2, p.209-215, 1996.

CHOI, Catherine H. et al. PDE-4 inhibition rescues aberrant synaptic plasticity in *Drosophila* and mouse models of fragile X syndrome. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n.1, p. 396-408, jan. 2015.

DE ESCH, Celine E. F.; ZEIDLER, Shimriet.; WILLEMSSEN, Rob. Translational endpoints in fragile X syndrome. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46P2, n. 2014, p. 256–269, out. 2014.

FARADZ, SMH et al. Genetic diversity at the FMR1 locus in the Indonesian population. **Annals of Human Genetics**, v.64, p.329–339, 2000.

FERNANDEZ-CARVAJAL, Isabel et al. Expansion of an *FMR1* grey-zone allele to a full mutation in two generations. **The Journal of Molecular Diagnostics : JMD**, v. 11, n. 4, p. 306–310, 2009.

FRISTCH, Patrícia Maria. **Triagem molecular para a síndrome do X-Frágil em pacientes com deficiência mental atendidos no HUB/UnB**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília), Brasília, Distrito Federal, 2011.

GÓMEZ, Marcela Kelly Astete. **Estudo dos alelos da região 5'UTR no gene *FMR1* (Fragile X Mental Retardation) em homens da população geral de Salvador – BA**. 2011. 75p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – Fundação Oswaldo Cruz), Salvador, Bahia, 2011.

HAMDAN, Hasnah et al. Automated detection of trinucleotide repeats in fragile X syndrome. **Molecular Diagnosis**, v.2, p.259-269, 1997.

HAGERMAN, Randi; HOEM, Gry; HAGERMAN, Paul. Fragile X and autism: intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. **Molecular Autism**, v.1, n.1, p.1-12, 2010.

HEULENS, Inge et al. Craniofacial characteristics of fragile x syndrome in mouse and man. **European Journal of Human Genetics**, v.21, p.816-823, 2013.

JANG, J.-H. et al. Frequency of *FMR1* premutation carriers and rate of expansion to full mutation in a retrospective diagnostic *FMR1* Korean sample. **Clinical Genetics**, v. 85, n. 5, p. 441–5, maio 2014.

KUNST, C.B. et al. Fmr1 in global populations. **American Journal of Human Genetics**, v.58, p.513-522, 1996.

MADALENA, Anne et al. 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 Laboratories of the American College of Medical Genetics. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v.3. p.200-205, 2001.

MANDEL, J.L.; BIANCALANA, V. Fragile x mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. **Growth Hormone & IGF Research**, v.14, p.158-165, 2004.

MCCARY, Lindsay M.; ROBERTS, J. E. Early identification of autism in fragile X syndrome: a review. **Journal of intellectual disability research : JIDR**, v. 57, n. 9, p. 803–14, set. 2013.

MINGRONNI-NETTO, Regina Célia et al. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. **American Journal of Medical Genetics**, v.111, p.243-252, 2002.

MYRICK, Leila K. et al. *FMR1* missense mutation associated with intellectual disability and seizures. **PNAS**, v.112, n.4, p.1-8, 2015.

NOLIN, Sarah et al. Fragile x full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. **Genetics in Medicine**, p.1-7, 2014.

NUSSBAUM, Robert L.; MCINNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PEPRAH, Emmanuel. Understanding decreased fertility in women carriers of the *FMR1* premutation: a possible mechanism for Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). **Reproductive health**, v. 11, n. 1, p. 67, jan. 2014.

PEPRAH, Emmanuel. Fragile X syndrome: the *FMR1* CGG repeat distribution among world populations. **Annals of Human Genetics**, v.76, p.178-191, 2012.

QUEIROZ, Mariana Arzua. **Avaliação da pré-mutação por PCR na Síndrome do X Frágil**. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2006.

ROSALES-REYNOSO MA, MENDOZA-CARRERA F, TROYO-SANROMAN R, MEDINA C, BARROS-NUNEZ P. Genetic Diversity at the *FMR1* Locus in Mexican Population. **Archives of Medical Research**, v.36, p. 412–417, 2005.

SETHNA, Ferzin; MOON, Changjong; WANG, Hongbing. From *FMRP* function to potential therapies for fragile X syndrome. **Neurochemical research**, v. 39, n. 6, p. 1016–31, jun. 2014.

SHERMAN, Stephanie; PLETCHER, Beth A.; DRISCOLL, Deborah A. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. **Genetics in Medicine**, v.7, n.8, p.584-587, 2005.

SILVA, Raquel Galvão. **Detecção de expansões CGG na população do estado de Pernambuco e verificação de sua relação com a síndrome do X-Frágil**. 2004. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética – Universidade Federal de Pernambuco), Recife, Pernambuco, 2004.

STEGANI, Fernanda Carla. **Desafios na avaliação genético-molecular de pacientes com suspeita de síndrome do X-Frágil atendidos na rede pública de saúde do Estado de Goiás**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado em Genética – Pontifícia Universidade Católica de Goiás), Goiânia, Goiás, 2011.

SUCHAROV, Carmen C et al. Fragile x trinucleotide repeats from a normal population in Rio de Janeiro, Brazil. **Hereditas**, v.130, p.189-190, 1999.

WINARNI, T. I. et al. Fragile X syndrome: clinical, cytogenetic and molecular screening among autism spectrum disorder children in Indonesia. **Clinical genetics**, v. 84, n. 6, p. 577–80, dez. 2013.

ZHOU, Y et al. FMR1 CGG repeat patterns and flanking haplotypes in three Asian populations and their relationship with repeat instability. **Annals of Human Genetics**, v.70, p.784–796, 2006.

4 CONCLUSÃO

Apesar de a Síndrome do X-Frágil ser considerada a condição genética mais observada em indivíduos portadores de Transtornos do Espectro Autista, neste estudo não foram encontrados pacientes apresentando expansão expressiva de CGG no alelo do gene *FMR1*, condizente com a manifestação desta síndrome. Este resultado pôde ter sido devido ao reduzido número amostral estudado.

Não foi possível aumentar o quantitativo de indivíduos para se realizar esta análise, uma vez que o critério de inclusão utilizado foi o de possuir diagnóstico positivo para Transtornos do Espectro Autista, e também que, nas duas instituições multidisciplinares que aceitaram participar da pesquisa, há muitos indivíduos com diagnóstico ainda em andamento. Outro fator que também não permitiu uma maior abrangência de portadores de TEA neste estudo foi a ausência de registros oficiais sobre a prevalência destes transtornos na população da cidade de Manaus. Em sítios eletrônicos como os Prefeitura de Manaus, Governo do Estado do Amazonas e Secretarias de Saúde, não há dados sobre a prevalência de TEA na população manauense ou amazonense, bem como, não há registros do número de instituições na cidade que assistem indivíduos portadores de TEA.

Apesar do pequeno número amostral, os resultados deste trabalho podem servir como base para a execução de estudos futuros sobre a frequência de mutações no gene *FMR1* em indivíduos da população do Estado do Amazonas, bem como para contribuir para o conhecimento da existência da Síndrome do X-Frágil por parte dos pais e responsáveis por portadores de TEA e ainda por parte dos profissionais que os assistem.

5 REFERÊNCIAS

AAIDD American Association on Intellectual and Developmental Disorders. Disponível em: <http://aidd.org/intellectual-disability/definition/faqs-on-intellectual-disability#.VMpiyWjF9qU>. Acesso em: 29 jan. 2015.

ABBEDUTO, Leonard; MCDUFFIE, Andrea; THURMAN, Angela J.; The fragile X syndrome-autism comorbidity: what do we really know? **Frontiers in Genetics**, n. October, p. 1-10, out. 2014.

AMÂNCIO, Andrea Pires. **Análise molecular de pacientes com suspeita da síndrome do X-Frágil.** 2013. 75p. Dissertação (Mestrado em Genética – Pontifícia Universidade Católica de Goiás), Goiânia, Goiás, 2013.

BAGNI, Claudia et al. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122, n.12, p.4314-22, dez. 2012.

BARON-COHEN, Simon et al. Why are autism spectrum condition more prevalent in males? **PLoS Biology**, v. 9, n.6, p.1-10, jun. 2011.

BONAVENTURE, G et al. Fragile X founder effect found in Argentine. **American Journal of Medical Genetics**, v.79, p.200-204, 1998.

BOURGEOIS, James et al. A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70, n. 6, p. 852–62, jun. 2009.

BROWN, W.T. et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. **Journal of the American Medical Association**, v. 270, p.1569-1575, 1993.

BUYLE, Sonja et al. Founder effect in a Belgian-Dutch fragile x population. **Human Genetics**, v.92, p.269-272, 1993.

CHIURAZZI, P. et al. Fragile X founder chromosomes in Italy: a few initial events and possible explanation for their heterogeneity. **American Journal of Medical Genetics**, v.2, p.209-215, 1996.

CHOI, Catherine H. et al. PDE-4 inhibition rescues aberrant synaptic plasticity in *Drosophila* and mouse models of fragile X syndrome. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n.1, p. 396-408, jan. 2015.

Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10. Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas – Coord. Organiz. Mund. Da Saúde. Porto Alegre: Artmed, 1993.

COLLINS, Stephen C. et al. Array-based *FMR1* sequencing and deletion analysis in patients with a fragile X syndrome-like phenotype. **PloS one**, v.5, n.3, p. e9476, jan. 2010.

CRONISTER, Amy et al. Prevalence and instability of fragile X alleles: implications for offering fragile X prenatal diagnosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 111, n. 3, p. 596–601, mar. 2008.

DARNELL, Jeniffer C.; KLANN, Eric. The translation of translational control by *FMRP*: therapeutic targets of FXS. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 1530-1536, maio 2013.

DE DIEGO, Yolanda et al. Fragile x founder effect and distribution of cgg repeats among the mentally retarded population of Andalusia, South Spain. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.1-6, 2002.

DE ESCH, Celine E. F.; ZEIDLER, Shimriet.; WILLEMSSEN, Rob. Translational endpoints in fragile X syndrome. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46P2, n. 2014, p. 256–269, out. 2014.

DOYLE, Jeff J.; DOYLE, Joseph L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 1990, vol. 12, no. 1, p. 13-15.

DSM-5. MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS. American Psychiatric Association. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ELSABBAGH, Mayada et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Research**, v.5, p. 160-79, abril, 2012.

FARADZ, SMH et al. Genetic diversity at the *FMR1* locus in the Indonesian population. **Annals of Human Genetics**, v.64, p.329–339, 2000.

FERNANDEZ-CARVAJAL, Isabel et al. Expansion of an *FMR1* grey-zone allele to a full mutation in two generations. **The Journal of Molecular Diagnostics : JMD**, v. 11, n. 4, p. 306–310, 2009.

FILIPOVIC-SADIC, Stela et al. A novel *FMR1* PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 56, p. 399–408, 2010.

FRISTCH, Patrícia Maria. **Triagem molecular para a síndrome do X-Frágil em pacientes com deficiência mental atendidos no HUB/UnB.** 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília), Brasília, Distrito Federal, 2011.

FU, Ying H. et al. 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, dez. 1991.

GARBER, Kathryn; SMITH, Karen T; REINES, Danny; WARREN, Stephen T. et al. Transcription, translation and fragile X syndrome. **Current opinion in genetics & development**, v. 16, n. 3, p. 270–5, jun. 2006.

GARBER, Kathryn; VISOOTSAK, Jeannie; WARREN, Stephen T. Fragile X syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v.16, n.6, p.666-672, abr. 2008.

GASTEIGER et al. Fmr1 gene deletion/reversion: a pitfall of fragile X carrier testing. **Genetic Testing**, v.7, p.303-308, 2003.

GENEREUX, Diane; LAIRD, Charles. At what rate do new premutation alleles arise at the fragile X locus? **Human Genetics**, v.132, p.715-717, 2013.

GESCHWIND, Daniel H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, n. 9, p. 409–16, set. 2011.

GÓMEZ, Marcela Kelly Astete. **Estudo dos alelos da região 5'UTR no gene *FMR1* (Fragile X Mental Retardation) em homens da população geral de Salvador – BA.** 2011. 75p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – Fundação Oswaldo Cruz), Salvador, Bahia, 2011.

HAGERMAN, Randi; HOEM, Gry; HAGERMAN, Paul. Fragile X and autism: intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. **Molecular Autism**, v.1, n.1, p.1-12, 2010.

HAGERMAN, Paul; HAGERMAN, Randi J. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1338, n.1, p.58-70, 2015.

HAGERMAN, R. J.; ALTSHUL-STARK, D.; McBOGG, P. Recurrent otitis media in the fragile X syndrome. **Am J Dis Child**, v.141, n.2, p.184-187, feb. 1987.

HAGERMAN, R. J. Medical follow-up and pharmacotherapy. In: HAGERMAN, R. J.; HAGERMAN, P. J. (eds). **Fragile X syndrome: Diagnosis, Treatment and Research**, 3 ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2002, p.287-338.

HAGERMAN, Randi; AU, Jacky; HAGERMAN, Paul. *FMR1* premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v.3, n.3, p.211-224, 2011.

HAGERMAN, Randi; HARRIS, Susan. Autism profiles of males with Fragile X syndrome. **American Journal of Mental Retardation**, v.18, p.1199-1216, 2008.

HALL, Deborah; TASSONE, Flora; KLEPITSKAYA, Olga; LEEHEY, Maureen. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in *FMR1* gene gray zone alleles carriers. **Movement Disorders**, v.29, n.6, p.997-1003, 2012.

HAMOSH, Ada et al. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 514–517, set. 2005.

HAMDAN, Hasnah et al. Automated detection of trinucleotide repeats in fragile X syndrome. **Molecular Diagnosis**, v.2, p.259-269, 1997.

HESSEL, David et al. A solution to limitations of cognitive testing in children with intellectual disabilities: the case of fragile X syndrome. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 1, p.33-45, 2009.

HEULENS, Inge et al. Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. **European Journal of Human Genetics**, v.21, p.816-823, 2013.

JACQUEMONT, Sébastien et al. The challenges of clinical trials in fragile X syndrome. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 1237-1250, 2014.

JANG, J.-H. et al. Frequency of *FMR1* premutation carriers and rate of expansion to full mutation in a retrospective diagnostic *FMR1* Korean sample. **Clinical Genetics**, v. 85, n. 5, p. 441–5, maio 2014.

JIN, Peng; WARREN, Stephen T. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 6, p. 901–908, 1 abr. 2000.

JORDE, Lynn B.; CAREY, John C.; BAMSHAD, Michael J.; WHITE, Raymond L. **Genética Médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KAUFMANN, Walter et al. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: Communication, social interaction, and specific behaviors, **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.129, p.225-234, 2004.

KHANIANI, Mahmoud S. et al. An improved Diagnostic PCR Assay for identification of Cryptic Heterozygosity for CGG Triplet Repeat Alleles in the Fragile X Gene (*FMR1*). **Molecular Cytogenetics**, v. 1, p. 5, jan. 2008.

KUNST, C.B. et al. *Fmr1* in global populations. **American Journal of Human Genetics**, v.58, p.513-522, 1996.

LAI, Meng-Chuan; LOMBARDO, Michael V.; BARON-COHEN, Simon. Autism. **Lancet**, v. 383, n. 9920, p. 896–910, 8 mar. 2014.

Lane Community College Genetics. Disponível em: <http://laneccggenetics.pbworks.com/w/page/58174882/X%20linked%20Recessive%20Inheritance>. Acesso em: 09 jan. 2016.

LAUMONNIER, Frédéric; CUTHBERT, Peter C.; GRANT, Seth G. N. The role of neuronal complexes in human x-linked brain diseases. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, p. 205-220, fev. 2007.

LIPTON, Jonathan; SAHIN, Mustafa. Fragile X syndrome therapeutics: translation, meet translational medicine. **Neuron**, v. 77, n. 2, p. 212–3, 23 jan. 2013.

LIU, Xiaoxi; TAKUMI, Toru. Genomic and genetics aspects of autism spectrum disorder. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.452, p. 244-53, ago. 2014.

LIU et al. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in grey zone carriers. **Clinical Genetics**, v.84, n.1, p.74-77, 2013.

LUBS, H. A. A marker X chromosome. **The American Journal of Human Genetics**, v.21, p. 231-244, 1969.

MADALENA, Anne et al. 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 Laboratories of the American College of Medical Genetics. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v.3. p.200-205, 2001.

MALTER et al. **Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes**. *Nature Genetics*, v.15, p.165-169, 1997.

MANDEL, J.L. BIANCALANA, V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues. **Growth Hormone & IGF Research**, v.14, p.158-165, 2004.

MARTINS, Márcia P. Perturbações do espectro X frágil: aspectos clínicos. In: FRANCO, Victor (ed.). *Síndrome do X Frágil: Pessoas, Contextos e Percursos*. Curitiba, Ed. UFPR, 2014, p. 23-42.

MARTIN, J.P.; BELL, Julia. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.6, p. 154-157, 1943.

MCCARY, Lindsay M.; ROBERTS, J. E. Early identification of autism in fragile X syndrome: a review. **Journal of intellectual disability research : JIDR**, v. 57, n. 9, p. 803–14, set. 2013.

MCLENNAN, Yangratana; POLUSSA, Jonathan; TASSONE, Flora; HAGERMAN, Randi. Fragile x syndrome. **Current genomics**, v. 12, n. 3, p. 216–24, maio 2011.

MEGUID, Nagwa et al. Simple molecular diagnostic method for Fragile X syndrome in Egyptian patients: Pilot study. **Acta biochimica Polonica**, v. 61, n. 2, p. 259–63, jan. 2014.

MINGRONNI-NETTO, Regina Célia et al. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. **American Journal of Medical Genetics**, v.111, p.243-252, 2002.

MOURÃO, Carlos, A.; ABRAMOV, Dimitri M. **Fisiologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MUSUMECI, S.A. et al. Epilepsy and EEG findings in males with fragile X syndrome. **Epilepsia**, v.40, p.1092-1099, 1999.

MYRICK, Leila K. et al. *FMR1* missense mutation associated with intellectual disability and seizures. **PNAS**, v.112, n.4, p.1-8, 2015.

National Fragile X Foundation (NFXF). Disponível em: <https://fragilex.org/fragile-x-associated-disorders/fragile-x-syndrome/autism-and-fragile-x-syndrome/>. Acesso em: 18 jun. 2015.

NGUYEN, Di K.; DISTECHE, Christine M. High expression of the mammalian X chromosome in brain. **Brain Research**, v.1126, n.1, p. 46-49, dez. 2006.

NOLIN, Sarah, L. et al. Expansion of the fragile X cgg repeat in females with premutation or intermediate alleles. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 454-464, jan. 2003.

NOLIN, Sarah L. et al. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, n. May, p. 1–7, 11 set. 2014.

NUSSBAUM, Robert L.; MCINNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLIVEIRA, Eder J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Research**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

OMIM: Online Mendelian Inheritance of Man. Fragile X Mental Retardation Syndrome #30064. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Acesso em: 30 dez. 2014.

PEARSON, Christopher E.; EDAMURA, Kerrie N.; CLEARY, John D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n.10, p. 729-742, 2005.

PENAGARIKANO, Olga; MULLE, Jennifer G.; WARREN, Stephen G. The pathophysiology of fragile x syndrome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.8, p.109-129, maio 2007.

PEPRAH, Emmanuel. Understanding decreased fertility in women carriers of the *FMR1* premutation: a possible mechanism for Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). **Reproductive health**, v. 11, n. 1, p. 67, jan. 2014.

PEPRAH, Emmanuel. Fragile X syndrome: the *FMR1* CGG repeat distribution among world populations. **Annals of Human Genetics**, v.76, p.178-191, 2012.

QUEIROZ, Mariana Arzua. **Avaliação da pré-mutação por PCR na Síndrome do X Frágil**. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2006.

RASKE, Christopher; HAGERMAN, Paul. Molecular pathogenesis of FXTAS. **Journal of Investigational Medicine**, v.57, n.8, p.825-829, 2006.

REYNIERS, Edwin et al. The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. **Nature genetics**, v. 4, n. 2, p. 143–6, jun. 1993.

ROBERTS, Jennifer L. et al. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic service. **Gene**, v.535, p.70-78, 2014.

ROSALES-REYNOSO MA, MENDOZA-CARRERA F, TROYO-SANROMAN R, MEDINA C, BARROS-NUNEZ P. Genetic Diversity at the FMR1 Locus in Mexican Population. **Archives of Medical Research**, v.36, p. 412–417, 2005.

ROUSSEAU, François et al. The fragile x mental retardation syndrome 20 years after the FMR1 gene discovery: an expanding universe of knowledge. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v.32, p.135-162, 2011.

SALUTO, Alessandro et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 7, n. 5, p. 605–612, nov. 2005.

SANDIN, S. et al. Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. **Molecular Psychiatry**, p.1-8, 2015.

SCHUELKE, Markus. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, fev. 2000.

SETHNA, Ferzin; MOON, Changjong; WANG, Hongbing. From *FMRP* function to potential therapies for fragile X syndrome. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 6, p. 1016–31, jun. 2014.

SHERMAN, Stephanie; PLETCHER, Beth A.; DRISCOLL, Deborah A. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. **Genetics in Medicine**, v.7, n.8, p.584-587, 2005.

SILVA, Raquel Galvão. **Detecção de expansões CGG na população do estado de Pernambuco e verificação de sua relação com a síndrome do X-Frágil**. 2004. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética – Universidade Federal de Pernambuco), Recife, Pernambuco, 2004.

STEGANI, Fernanda Carla. **Desafios na avaliação genético-molecular de pacientes com suspeita de síndrome do X-Frágil atendidos na rede pública de saúde do**

Estado de Goiás. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado em Genética – Pontifícia Universidade Católica de Goiás), Goiânia, Goiás, 2011.

SUCHAROV, Carmen C et al. Fragile x trinucleotide repeats from a normal population in Rio de Janeiro, Brazil. **Hereditas**, v.130, p.189-190, 1999.

SUTHERLAND,G. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. **Science**, v.197, p.265-266, 1977.

TALLANTYRE, E.; ROBERTSON, Neil. P. Autism and intellectual disability. **Journal of neurology**, v. 260, n. 3, p. 936–9, mar. 2013.

VÄISÄNEN, Marja Leena; HAATAJA, Ritva; LEISTI, Jaako. Decrease in the CGGn trinucleotide repeat mutation of the fragile X syndrome to normal size range during paternal transmission. **American Journal of Human Genetics**, v.59, p.540-546, 1996.

VERKERK, Annemieke et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v.65, p.905-914, 1991.

VITS, Lieve et al. Apparent regression of the CGG repeat in FMR1 to an allele of normal size. **Human Genetics**, v.94, p.523-526, 1994.

WHEELER, Anne C. et al. DSM-5 Changes and the Prevalence of Parent-Reported Autism Spectrum Symptoms in Fragile X Syndrome. **Journal of autism and developmental disorders**, 19 set. 2014.

WINARNI, T. I. et al. Fragile X syndrome: clinical, cytogenetic and molecular screening among autism spectrum disorder children in Indonesia. **Clinical genetics**, v. 84, n. 6, p. 577–80, dez. 2013.

WOAD, K.J. et al. The genetic basis of premature ovarian failure. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v.46, p.242–244, 2006.

ZHOU, Y et al. FMR1 CGG repeat patterns and flanking haplotypes in three Asian populations and their relationship with repeat instability. **Annals of Human Genetics**, v.70, p.784–796, 2006.

ANEXOS

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Senhores pai, mãe ou responsáveis

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário deste estudo intitulado “Investigação Molecular Da Síndrome Do X-Frágil Em Portadores De Transtornos Do Espectro Autista Assistidos por Uma Instituição De Manaus, Amazonas”, porque apresenta perfil compatível e preenche os critérios para ser incluso nesta pesquisa na condição de sujeito. *Sujeito da pesquisa* é a expressão dada a todo ser humano que, de livre e espontânea vontade e após devidamente esclarecido, concorda em participar de pesquisa, doando material biológico, submetendo-se a variados procedimentos invasivos ou não, ou ainda fornecendo informações.

Os Transtornos do Espectro Autista (TEAs) são condições que atingem o desenvolvimento cerebral prejudicando o estabelecimento da interação social recíproca e da comunicação verbal e não verbal e são acompanhados por comportamentos repetitivos e padrões diferentes de interesse e atividades. A Síndrome do X-Frágil é o distúrbio genético mais estudado, relacionado com o diagnóstico do autismo, sendo importante devido ao fator hereditário, isto é, transmitido aos filhos através do material genético dos pais. Assim o presente estudo tem como objetivo investigar uma das possíveis causas do autismo, importante para a melhor compreensão destas condições que permitirá o tratamento adequado, estudo de recorrência na família e aconselhamento genético.

Neste estudo, será realizada primeiramente uma entrevista com o objetivo de fornecer informações sobre aspectos de diagnósticos e análise de características clínicas relacionadas à Síndrome do X-Frágil e ao autismo. Também será realizada a análise do gene *FMR1*, presente na molécula de DNA. Para esta análise será solicitada a coleta de células da mucosa bucal, utilizando para isso um bastão de Swab. A partir desta coleta será extraído o DNA dos indivíduos que participam desta pesquisa. Este DNA será submetido a análises genéticas, em uma técnica

denominada PCR. A partir desta técnica, será verificado se o paciente tem uma mutação (alteração) no gene, o que determinará o diagnóstico positivo para a Síndrome do X-frágil. Esta análise será realizada no Laboratório de Proteômica e Genômica, localizado na Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas, bairro Cachoeirinha.

Você, como responsável, terá toda autonomia para decidir se seu (sua) filho (a) participa ou não na pesquisa. Também, você terá toda liberdade para retirar seu (sua) filho (a) do estudo a qualquer momento, sem prejuízo de qualquer natureza. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Tanto a identidade do participante, quanto os dados fornecidos serão mantidos sob absoluta confidencialidade e, portanto, ninguém mais terá conhecimento sobre a participação.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade e de seu filho com padrões profissionais de sigilo. Você e seu filho não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no laboratório de Genética Humana, na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas.

Embora a natureza desta pesquisa apresente risco muito baixo, existe a garantia de indenização por parte da Instituição promotora da pesquisa, do investigador e do patrocinador (quando houver) se acontecer dano (s) à sua saúde, em decorrência da pesquisa; e a decisão de participar do estudo não está de maneira alguma associada a qualquer tipo de recompensa financeira ou em outra espécie.

Esta pesquisa é pioneira em nosso Estado e importante para o serviço de orientação genética e ao final ou durante a pesquisa os pesquisadores colocam-se à disposição para esclarecimentos sobre a hereditariedade da condição em questão.

Caso o seu filho apresente o diagnóstico positivo para a Síndrome do X-Frágil você será informado e orientado para os procedimentos médicos adequados.

Sempre que for necessário esclarecer alguma dúvida sobre o estudo, você deverá buscar contato com os Coordenadores da Pesquisa **Profa. M.Sc. Lucivana**

Prata de Souza, Fone: (92)98129-0258 (vivo), **Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende**, Fone (92)98182-8204 e o acadêmico **Jorge Frank Braga Ferreira**, Fone (92) 98240-5219 / 99154-9163, na Escola Superior de Ciências da Saúde da UEA, na Avenida Carvalho Leal, 1777. Cachoeirinha.

No presente documento (TCLE) serão obtidas as assinaturas do responsável pelo menor e dos pesquisadores, assim como em todas as páginas as rubricas do pesquisador e do responsável pelo menor;

CONSENTIMENTO

Declaro que li, tomei conhecimento e entendi os aspectos da pesquisa. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.

Declaro que concordo voluntariamente em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Caso o material coletado seja utilizado em nova pesquisa sobre a genética do autismo desejo:

- a elaboração de um novo consentimento a cada pesquisa;
- a dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

Assinatura do pai/responsável (em caso do sujeito ser menor) ou impressão
datiloscópica

Residência:

Fone(s): _____

MEMBROS DA PESQUISA

Lucivana Prata de Souza

Professora Coordenadora do Projeto

ESA/UEA

Cleiton Fantin Rezende

Professor-Orientador

MBT/UEA

Jorge Frank Braga Ferreira

Acadêmico de Pós-Graduação em Biotecnologia

MBT/UEA

Manaus, _____ de _____ de 2015.

Anexo II

Protocolo de Extração de DNA por CTAB 2%

- Friccionar o bastão de Swab na mucosa jugal do indivíduo, por aproximadamente 20 vezes. Após isso, inserir imediatamente o bastão em microtúbulo contendo 300µL de Tris-EDTA;
- Centrifugar o microtúbulo com a amostra, a 8.000 rpm por 2 minutos. Descartar o sobrenadante, tomando o cuidado de manter as amostras de células depositadas no fundo do microtúbulo;
- Inserir no microtúbulo 500µL de solução CTAB, previamente aquecida em banho-maria a 60°C por 30 minutos;
- Adicionar 4µL de **RNase** (10mg/mL), homogeneizar a solução (sem movimentos bruscos) por 5 minutos e incubar à 37°C por 30 minutos;
- Adicionar 5µL de **Proteinase K** (10mg/mL) e incubar as amostras à 55°C por 90 minutos, agitando os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a solução (ou deixar *overnight*);
- Deixar as amostras em temperatura ambiente, adicionar 500µL de **Clorofórmio-Álcool Isoamílico** (CIA – 24:1) e misturar suavemente por inversão em mesa agitadora durante 5 minutos;
- Centrifugar as amostras a 10.000rpm por 10 minutos;
- Coletar o sobrenadante e transferir para um novo tubo previamente identificado;
- Adicionar 400µL de **Isopropanol 100%** resfriado e misturar suavemente por inversão durante 2 minutos para que as nuvens de DNA sejam observadas;
- Incubar o material a -20°C (congelador) por 1 a 2 horas para que ocorra a precipitação;

- Centrifugar as amostras a 13.000rpm por 15 minutos e o DNA ficará visível na forma de um pequeno *pellet*;
- Descartar o sobrenadante e inverter o tubo em papel absorvente. Adicionar 1mL de **Etanol 70%** e inverter os tubos por 5 minutos para lavar o *pellet*;
- Centrifugar as amostras a 13.000rpm por 15 minutos;
- Descartar o sobrenadante sem deslocar o *pellet*, inverter os tubos em papel absorvente e esperar secar por 3 horas;
- Diluir o *pellet* em 30 μ L de **água ultrapura**.