



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Maria Teresa Martins Viveiros**

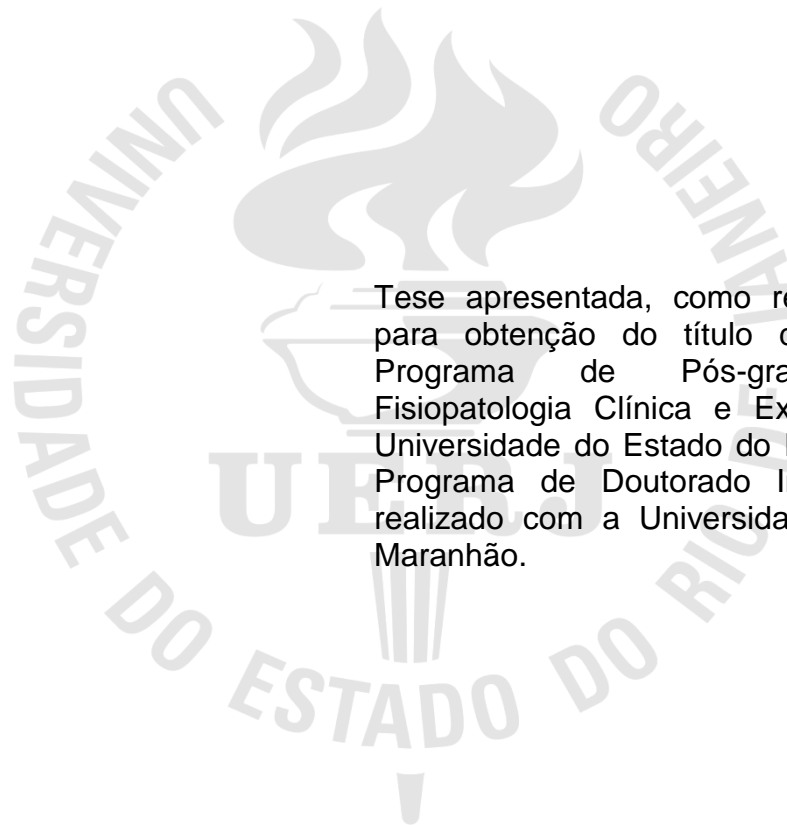
**Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência  
mental idiopática no Maranhão:  
diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil**

**Rio de Janeiro**

**2013**

Maria Teresa Martins Viveiros

**Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental  
idiopática no M aranhão:  
diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas

Rio de Janeiro

2013

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/A

V857 Viveiros, Maria Teresa Martins

Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil / Maria Teresa Martins Viveiros. 2013.

89 f.: il.

Orientadora: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Coorientadora: Arlene de Jesus Mendes Caldas

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

1. Deficiência mental – Teses. 2. Doenças mentais – Aspectos genéticos – Teses. 3. Cromossomos humanos – Anomalias – Teses. 4. Mutação – Teses. I. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. II. Caldas, Arlene de Jesus Mendes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.899

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Maria Teresa Martins Viveiros

**Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental  
idiopática no Maranhão:  
diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 19 de março de 2013.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Dr. Mário Campos Junior  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Aos pacientes especiais e seus familiares com os quais aprendo a cada dia que passa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me iluminado em todos os momentos da elaboração desta pesquisa, e em momentos difíceis me deu forças para seguir em frente.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Mattos Pimentel pela contribuição dada na minha formação como docente da UFMA, incentivo, orientação segura e ainda, por ter sido ao longo dessa jornada uma referência como pesquisadora e uma grande amiga em momentos difíceis durante esse percurso.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Arlene Mendes Caldas, pelo incentivo, ajuda e atenção e orientação.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa pela colaboração e ajuda em todos os momentos que foram solicitados.

À Jussara e Flávia pelo apoio, ajuda técnica e acolhimento.

Ao amigo e professor Biólogo Max Diego Cruz Santos, que sem sua ajuda seria difícil entender a base fundamental para elaboração dessa tese.

Ao estudante de Enfermagem e bolsista do CNPq Marcos e a técnica de enfermagem Maria do Carmo pela ajuda durante as coletas nas Instituições.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC).

Ao Professor Geraldo Melônio do Nascimento pelas as orientações sobre a clínica da síndrome do X frágil.

À pediatra Leticia Martins pela ajuda e contribuição.

Aos pacientes, familiares, professores e funcionários das Instituições: Escola Helena Antipoff, Escola João Mohana, Clínica Laravedière e Clínica São Francisco de Neuropsiquiatria e a APAE-MA.

A minha amiga Rita Ivana pelo grande companherismo e incentivo.

A todos os meus amigos que me incentivaram nesse grande desafio.

A toda minha família, meu irmão José Reinaldo que muito contribuiu. Meus pais, José Martins e Maria de Castro Martins (in memoriun), por terem me ensinado a valorizar o conhecimento e dedicar-me ao estudo. Minhas filhas Delane e Ludmila pelo ajuda e contribuição e também pelo meu filho Breno (in memoriun) que, embora esteja ausente fisicamente, em momentos difíceis me deu força pra continuar esse trabalho. A minha amiga Raimunda Reis pelo companheirismo. E em especial, ao

meu companheiro de todas as horas, Raimundo Nonato Viveiros pelo incentivo e compreensão nas horas que estive ausente.

## RESUMO

VIVEIROS, Maria Teresa Martins. *Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da síndrome do X frágil*. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro e Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

O retardo mental (RM) representa um problema de saúde pública mundial ainda negligenciado no Brasil e, em especial nas regiões mais pobres como o Nordeste. A síndrome do X frágil (SXF) é uma das formas mais estudadas de RM hereditário em seres humanos. Esta doença monogênica, de herança ligada ao X dominante, é decorrente de uma mutação no exon 1 do gene *FMR1*, localizado na região Xq27.3. A mutação no *FMR1* se caracteriza pelo aumento de repetições de trinucleotídeos CGG em *tandem* na região 5' UTR desse gene, sendo a expansão dessas trincas o principal evento mutacional responsável pela SXF. De maneira geral, os fenótipos cognitivos de indivíduos do sexo masculino com a síndrome incluem deficiência intelectual de moderada à grave. No presente trabalho, realizamos um estudo transversal da SXF em indivíduos portadores de retardo mental de causa desconhecida, engajados em Programas de Educação Especial e em instituições psiquiátricas de São Luís-MA, rastreando ampliações de sequências trinucleotídicas no gene *FMR1*. A amostra foi composta por 238 indivíduos do sexo masculino, não aparentados, na faixa etária de 4 a 60 anos (média =  $21 \pm 9$  anos). O DNA dos participantes foi obtido a partir de 5 mL de sangue coletados em tubos com anti-coagulante EDTA e a análise molecular da região gênica de interesse foi realizada através da reação em cadeia da polimerase, utilizando-se três primers. Dentre os indivíduos triados quanto à presença de mutações no gene *FMR1*, apenas um apresentou um resultado inconclusivo e 2 (0,84%) foram positivos para a SXF, sendo que um deles (3503) apresentou mais de 200 repetições CGG no *locus* FRAXA e o outro indivíduo (3660) apresentou uma deleção de ~197 pb envolvendo parte das repetições CGG e uma região proximal às repetições CGG. Ambos possuíam história familiar de RM ligado ao X. No indivíduo 3503 observamos as seguintes características clínicas: temperamento dócil, orelhas grandes, mandíbula proeminente e flacidez ligamentar. O indivíduo 3660 apresentava hiperatividade, contato pobre com os olhos, orelhas grandes, mandíbula proeminente, *pectus excavatum*, macroorquidismo e pouca comunicação. O esclarecimento sobre a doença oferecido às famílias de ambos contribuiu sobremaneira para o entendimento da condição, do prognóstico e dos riscos de recorrência. A prevalência da SXF em nossa amostra, 0,84%, embora relativamente baixa, encontra-se na faixa de incidência de casos diagnosticados em outras populações que, em sua maioria, relatam incidências variando de 0 a 3%. Em parte, atribuímos o percentual encontrado aos critérios de inclusão utilizados em nosso estudo. Concluímos que o protocolo de triagem molecular utilizado em nosso estudo se mostrou eficiente e adequado para a realidade do Maranhão, podendo constituir uma ferramenta auxiliar a ser aplicada na avaliação de rotina dos portadores de RM, com grandes benefícios para o Estado.

Palavras-chave: Síndrome do X Frágil. Retardo mental. Mutação. *FMR1*.



## ABSTRACT

Mental retardation (MR) is considered a global public health problem in Brazil and it is still ignored mainly in poor regions like Northeast Brazil. The fragile X syndrome (FXS) is one of the most common heritable disease in humans. It is a monogenic disease with X-linked dominant inheritance due to a mutation in exon 1 of the *FMR1* gene, located at Xq27.3 region. The mutation in *FMR1* is characterized by the increase in number of CGG repeats in the 5' UTR of the gene. This expansion of CGG triplets in the first exon of the *FMR1* gene is the main mutational event responsible for FXS. In general, the cognitive phenotypes of males with this syndrome include intellectual disabilities from moderate to severe. In this work, we conducted a cross-sectional study of FXS in individuals with MR of unknown cause, in Especial Education Programs and Psychiatric Institutions in São Luís-MA, by screening for amplifications of trinucleotide sequences within the *FMR1* gene. The sample consisted of 238 unrelated males, whose ages were from 4 to 60 years (mean =  $21 \pm 9$  years). The DNA of all individuals was obtained from 5 mL of peripheral blood which was collected in EDTA-anticoagulated tubes. The molecular analysis of the genetic region of interest was performed by polymerase chain reaction using three primers. Of the individuals screened for the presence of the mutation in the *FMR1* gene, only one was inconclusive and two (0.84%) were positive for FXS. One (3503) presented more than 200 CGG repeats in FRAXA locus, and the other (3660) presented with a ~ 197 bp deletion involving part of CGG repeats and a proximal region to the CGG repeats. Both of these individuals have family history of X-linked Mental Retardation. The individual 3503 has the following clinical features: docile temperament, large ears, prominent jaw and ligamentous laxity. The individual 3660 presents hyperactivity, poor contact with eyes, large ears, prominent jaw, pectus excavatum, macroorchidism and little communication. Information about the disease helped the families of both individuals with FXS to understand the condition, the prognosis and about the recurrence risk. We found a FXS prevalence of 0.84% in our sample, although relatively low, it is in the range of incidence of diagnosed cases in other populations that report mostly incidences ranging from 0 to 3%. We partially attribute the percentage found due to the inclusion criteria used in our study. We conclude that the protocol for molecular screening used in our study proved to be efficient and appropriate to the reality of Maranhão, constituting an auxiliary tool to be applied in the routine assessment of patients with MR, with great benefits for the state.

Keywords: Fragile X Syndrome. Mental Retardation. Mutation. *FMR1*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Visão geral das causas de retardo mental.....	16
Figura 1 -	Micrografia eletrônica mostrando o sítio frágil na região Xq27.3	17
Figura 2 -	Paradoxo de Sherman.....	19
Figura 3 -	Gene <i>FMR1</i> .....	21
Figura 4 -	Proteína FMRP e gene <i>FMR1</i> .....	22
Figura 5 -	Esquema da transcrição e tradução do gene <i>FMR1</i> .....	23
Figura 6 -	Aumento ou diminuição do número de repetições de marcadores STRs por <i>replication slippage</i> .....	25
Figura 7 -	Redução da força sináptica nas células dendríticas na síndrome do X frágil em relação ao normal.....	28
Quadro 1 -	Instituições envolvidas na pesquisa.....	36
Quadro 2 -	Concentração dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase.....	41
Figura 8 -	Esquema do gene <i>FMR1</i> e estratégia de triagem por PCR .....	43
Quadro 3 -	Indivíduos participantes da análise molecular do gene <i>FMR1</i> .....	46
Figura 9 -	Gel de poliacrilamida e heredograma do indivíduo 3503.....	56
Figura 10 -	Gel de poliacrilamida e heredograma do indivíduo 3660.....	56
Figura 11 -	Eletroferograma e região deletada do indivíduo 3660 .....	57
Figura 12 -	Foto do indivíduo 3503 com a expansão CGG no gene <i>FMR1</i> ..	58
Figura 13 -	Heredograma do probando 3503.....	58
Figura 14 -	Foto da família do indivíduo 3660 com deleção no gene <i>FMR1</i> ..	59
Figura 15 -	Heredograma do probando 3660.....	60
Gráfico 2 -	Distribuição das características clínicas, físicas comportamentais dos indivíduos analisados para SXF.....	61
Gráfico 3 -	Distribuição dos probandos analisados por idade.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do retardo mental de acordo com o quociente de inteligência.....	15
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase .....	40
Tabela 3 - Resultados quanto à presença de mutação.....	55
Tabela 4 - Fenótipo dos indivíduos que apresentam mutação no gene <i>FMR1</i>	62
Tabela 5 - Estimativa de prevalência da síndrome do x frágil em indivíduos com desabilidade intelectual.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ADHD	Desordem de déficit de atenção com hiperatividade
APAE	Associação dos Pais e Amigos dos excepcionais
CEPEC-MA	Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>FMR1</i>	<i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
FMRP	Fragile Mental Retardation Protein
FXR1	Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1
FXR2	Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 2
FXR1P	Fragile X Mental Retardation, Syndrome-related Protein 1
FXR2P	Fragile X Mental Retardation, Syndrome-related Protein 2
FXTAS	Síndrome do tremor/ataxia associado ao X frágil
QI	Quociente de inteligência
KH1	Domínios de homologia á ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas humana K 1
KH2	Domínios de homologia á ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas humana K 2
MBP	Proteína mielínica básica
mL	Mililitro
mRNP	Partículas de ribonucleoproteínas mensageiras
NES	Sinal de exportação nuclear
NLS	Sinal de localização nuclear
NMT	Macho normal transmissor
OMS	Organização mundial de saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POF	Falha ovariana prematura
Pré –RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro primário
RGG Box	Bloco RGG
RM	Retardo mental
RNA	Ácido ribonucleico

RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SERVGEN	Serviço de Genética Humana da UERJ
STRs	Pequenas Repetições em <i>tandem</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SXF	Síndrome do X frágil
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UTR	Região não traduzida
XLMR	Retardo mental ligado ao X

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>O RETARDO MENTAL NO MUNDO</b> .....	15
1.1	<b>A síndrome do X frágil</b> .....	17
1.1.1	<u>Padrão de herança</u> .....	18
1.1.2	<u>Características clínicas da SXF</u> .....	19
1.1.3	<u>O gene <i>FMR1</i> e a base molecular SXF</u> .....	20
1.1.4	<u>A proteína FMRP</u> .....	25
1.1.5	<u>Diagnóstico molecular</u> .....	28
1.1.6	<u>Aconselhamento genético e terapias alternativas</u> .....	30
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	32
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	32
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
4.1	<b>Tipo de estudo</b> .....	33
4.2	<b>Critérios de exclusão</b> .....	33
4.3	<b>Amostra</b> .....	34
4.4	<b>Avaliação Clínica</b> .....	37
4.5	<b>Métodos</b> .....	37
4.6	<b>Avaliação Molecular</b> .....	38
4.6.1	<u>Extração de DNA</u> .....	38
4.6.2	<u>Estimativa da concentração e da integridade do DNA</u> .....	39
4.6.3	<u>Identificação de amplificações no gene <i>FMR1</i> por PCR</u> .....	39
4.6.4	<u>Reação de sequenciamento</u> .....	44
4.6.5	<u>Análise das sequências</u> .....	45
5	<b>RESULTADOS</b> .....	46
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	69

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>ANEXO A</b> - Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	86
<b>ANEXO B</b> - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	88
<b>ANEXO C</b> - Ficha clínica.....	89

## INTRODUÇÃO

O retardo mental, embora não seja abordado de forma abrangente pelos órgãos responsáveis pela saúde no Brasil, constitui-se em um importante problema de saúde pública e deve ser levado em consideração em políticas públicas de promoção à saúde, principalmente em países de baixa renda.

A síndrome do X frágil (SXF) é uma das formas mais estudadas de RM hereditário em seres humanos (Turner et al., 1996; De Vries et al., 1998; Kooy et al., 2000). Em São Luís, assim como em todo o Maranhão, de acordo com o nosso conhecimento, não foram realizados estudos sobre a SXF utilizando o diagnóstico molecular em escolas especiais e hospitais psiquiátricos. Dessa forma, esse trabalho vem contribuir para um melhor entendimento sobre esta doença.



## 1 O RETARDO MENTAL E SUA INCIDÊNCIA NO MUNDO

O retardo mental (RM), por ser uma condição complexa, não é facilmente definido (Ropers e Hamel, 2005). Devido ao seu conceito ser muito vasto e sofrer as influências no qual está estruturado, trata-se de condição clínica difícil de ser precisada, a qual, tende a ser denominada por aqueles que trabalham na área com a designação de deficiência intelectual (Assunção Jr, 2011). A definição mais usada (American Psychiatric Association, 1994) compreende três critérios: 1) funcionamento intelectual geral significativamente abaixo da média [quociente de inteligência (QI) menor que 70]; 2) limitações significativas no funcionamento adaptativo em pelo menos duas das seguintes áreas de habilidades - comunicação, autocuidado, capacidade de viver de forma independente, habilidades sociais e interpessoais, uso de serviços públicos, tomada de decisões, habilidades acadêmicas funcionais, trabalho, lazer, saúde, segurança 3) manifestação desses sintomas antes dos 18 anos. Com base no QI, o RM é subdividido em várias classes. Mais comumente a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1980) utiliza a classificação e terminologia como descrita na tabela 1. Contudo, muitos estudos utilizam apenas as terminologias leve (QI 50-70) e grave (QI <50) (Ropers e Hamel, 2005).

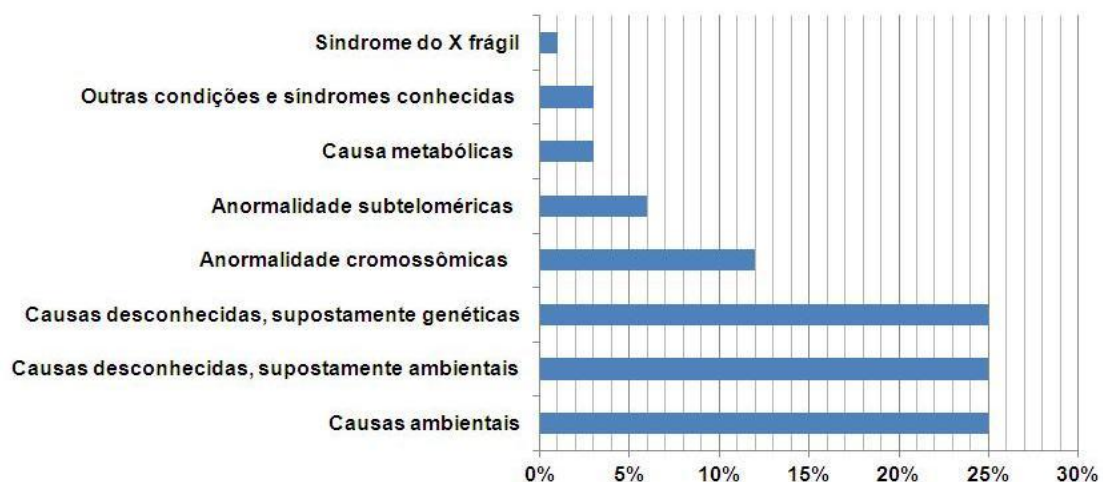
Tabela 1. Classificação do retardo mental de acordo com o quociente de inteligência

Terminologia	Quociente de inteligência (QI)
Profundo	<20
Severo	20-35
Moderado	35-50
Brando	50-70
Limítrofe	70-85

Em pesquisa realizada em diversos países nos anos 80, incluindo o Brasil como país representante da América Latina, foi encontrada uma prevalência de 6,7% de desabilidade intelectual grave em uma amostra de 1.050 crianças entre 6 e 9 anos de idade (Stein et al., 1986). Um estudo com 500 crianças entre 6 e 12 anos, conduzido no Rio de Janeiro, identificou 4% com QI abaixo de 70 (Assis, 2009).

O RM representa um problema de saúde pública mundial ainda negligenciado no Brasil e, em especial nas regiões mais pobres como o Nordeste. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004) o RM não pode ser “curado” com tratamentos medicamentosos. Assim, a principal abordagem na conduta dos indivíduos com essa condição é através do cuidado relacionado a evidências científicas, necessidades humanísticas, perspectivas familiares, normatização e integração (OMS, 2004). As causas do RM são vastamente heterogêneas e compreendem tanto insultos ambientais, exemplificados por má nutrição da mãe, acidentes perinatais e exposição intrauterina a agentes teratogênicos, como alterações genéticas. Estima-se que metade de todos o casos de RM seja decorrente de fatores ambientais e a outra metade devida a fatores genéticos (Winnepenninckx et al., 2003) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Visão geral das causas de retardo mental. Adaptado de Curry et al., 1997.



Fatores como má nutrição, falta de cuidados pré-natais e exposição a agentes químicos e infecciosos, comuns em países de baixa e média renda, podem contribuir para a maior prevalência de RM na América Latina (Katz et al., 2008; Sotelo, 2008 ).

Observa-se também, em diferentes populações, que o número de homens com deficiência mental ultrapassa em aproximadamente 30% o número de mulheres (Stevenson, 2000), o que evidencia, em relação aos fatores genéticos envolvidos, a importância de genes ligados ao cromossomo X na etiologia do RM. Sabemos hoje que 40% dos mais de 1.200 genes funcionais do cromossomo X são expressos no cérebro (Ropers, 2006).

### 1.1 A síndrome do X frágil

A síndrome do X frágil (SXF) é uma das formas mais estudadas de RM hereditário em seres humanos (Turner et al., 1996; De Vries et al., 1998; Kooy et al., 2000). Trata-se de uma das primeiras doenças humanas associada a uma mutação dinâmica decorrente da expansão de trinucleotídeos, no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), localizado no cromossomo X (Jin e Warren, 2000). Em raros casos, SXF ocorre devido a uma mutação de ponto ou a deleção em parte do gene (De Boulle et al., 1993; Coffee et al., 2008). O nome X frágil é devido a observação, por técnicas citogenéticas, de um sítio frágil no cromossomo X na região Xq27.3 (Sutherland et al., 1977) (Figura 1).

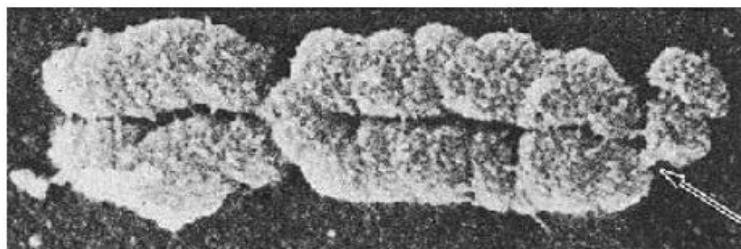


Figura 1. Micrografia eletrônica mostrando o sítio frágil na região Xq27.3 Adaptado de Strachan e Read , 2005. Cap. 11.5.

Esta síndrome é a principal causa de RM hereditário em todas as populações e grupos étnicos (Sutherland et al., 1993; Warren e Nelson, 1994), representando cerca de 30% do RM hereditário e sendo associado a alterações comportamentais, físicas e cognitivas (Crawford et al., 2001; Terracciano et al., 2005). Sua incidência é de aproximadamente 1 em cada 3.600 homens e 1 em 8.000 mulheres na população geral (Turner et al., 1996; De Vries et al., 1998; Kooy et al., 2000), sendo considerada a doença de maior importância epidemiológica entre homens com deficiência mental (Webb et al., 1986) e, deste modo, mostra-se de grande interesse clínico e científico.

Martin e Bell (1943) descreveram vários homens com RM e com história familiar altamente indicativa de herança ligada ao cromossomo X. Em 1969, Lubs encontrou uma constrição secundária na extremidade do braço longo do cromossomo X em quatro homens com RM e três mulheres portadoras obrigatórias em uma única família (Lubs, 1969). Richards e Sutherland (1994) posteriormente analisaram o heredograma descrito por Martin e Bell e constataram que os homens afetados tinham a SXF. Atualmente, tanto a síndrome de Martin e Bell como a do X marcador são denominadas síndrome do X frágil (Penagarikano et al., 2007).

Os sítios frágeis são nomeados pelo termo FRA, que significa *fragility* (fragilidade, em português), seguido pelo cromossomo onde eles estão localizados e uma letra indicando a ordem em que eles foram descobertos (Berger et al., 1985). No caso da síndrome do X frágil, o sítio frágil denomina-se FRAXA.

### 1.1.1 Padrão de herança

A SXF é uma doença monogênica, de herança ligada ao X dominante, decorrente de uma mutação no exon 1 do gene *FMR1*, localizado na região Xq27.3 (Fu et al., 1991; Oberlé et al., 1991; Verkerk et al., 1991).

Em relação ao padrão de herança, a SXF apresenta algumas características não observadas em outras condições de herança ligada ao X dominante (Pembrey et al., 2001). Nos heredogramas de indivíduos com a síndrome, é possível observar homens, aparentemente normais, transmitindo a doença. Estes homens designados machos normais transmissores (NMT, do inglês, *Normal Transmitting Males*), por

apresentarem inteligência normal, se tornaram altamente conhecidos, sendo seus fenótipos bem documentados (Sherman et al., 1984). Mães e filhas de NTMs têm diferentes riscos de ter prole afetada, observando-se um aumento progressivo destes riscos nas gerações sucessivas (Sherman et al., 1984, 1985). Este padrão de herança complexo associado à SXF foi denominado Paradoxo de Sherman e é descrito na figura 2.

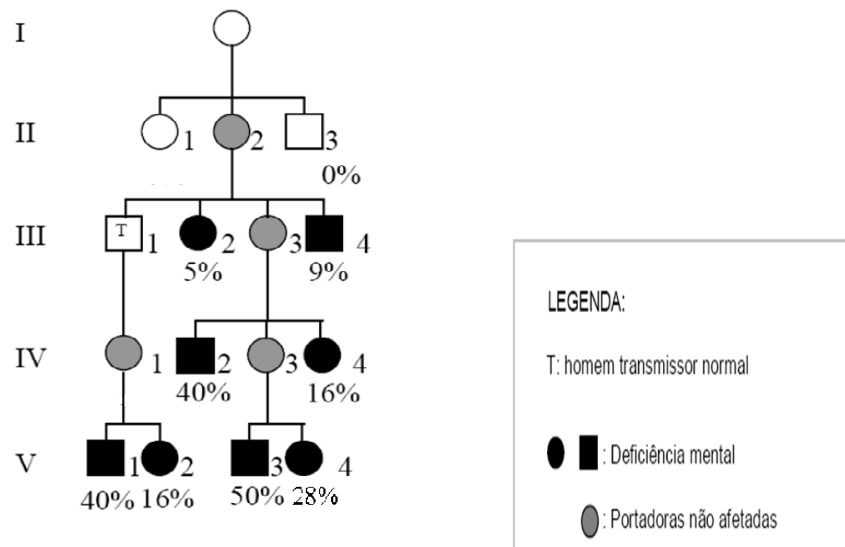


Figura 2. Paradoxo de Sherman. O Risco empírico de retardo mental aumenta de acordo com a posição no heredograma. O heredograma mostra o risco percentual (abaixo de cada indivíduo) de retardo mental baseado em estudos de famílias com X frágil. (Sherman et al., 1985).

### 1.1.2 Características clínicas da SXF

Indivíduos portadores da SXF apresentam uma significativa heterogeneidade fenotípica, o que torna difícil o diagnóstico da doença em termos clínicos. De maneira geral, os fenótipos cognitivos de indivíduos do sexo masculino com a síndrome incluem deficiência intelectual de moderada à grave (Gothelf et al., 2005; Hessler et al., 2009), déficits na função executiva, na memória de curto prazo, no controle da atenção e no processamento aritmético e visual espacial (Schapiro et al.,

1995). O fenótipo comportamental inclui pouco contato com os olhos, agitação com as mãos, mordidas nas mãos, ansiedade, hiperatividade, impulsividade, defensividade tátil, déficit de atenção, hipervigilância a estímulos sensoriais e, ainda, déficit de interação social, como timidez excessiva e agressão (Sullivan et al., 2006; Hallahan et al., 2012). Muitos meninos com SXF exibem comportamento autista (Kaufman et al., 2004).

Entre as características físicas mais comuns temos as orelhas proeminentes, a face alongada e o macroorquidismo. Hiperextensibilidade das articulações, palato alto e pés chatos também podem ocorrer (Hagerman e Hagerman, 2002).

Indivíduos do sexo feminino com SXF manifestam fenótipos mais brandos, devido ao cromossomo X não mutado produzir alguma quantidade da proteína FMRP (relacionada à taxa de inativação do X), embora seja difícil prever a gravidade dos sintomas com base nessa atividade do cromossomo. Em geral, as mulheres com a síndrome têm uma inteligência média ou deficiência intelectual branda e muitas vezes tem déficit de função executiva (Riddle et al., 1998). Elas também manifestam transtornos de humor e ansiedade social, acanhamento, características de desordem de déficit de atenção com hiperatividade (ADHD) combinada com déficit de linguagem e outros (e.g. deficiência em matemática) (Gothelf et al., 2005; Mazzocco et al., 2006; Roberts et al., 2009).

A heterogeneidade fenotípica observada na SXF está relacionada ao tipo de mutação no gene *FMR1* e ao mosaïcismo somático, comum nesta condição (Hagerman et al., 1994; Merenstein et al., 1996; Kaufmann et al., 1999, 2004).

### 1.1.3 O gene *FMR1* e a base molecular da SXF

O gene *FMR1*, com 38 kb de comprimento, possui 17 exons (figura 3) (Ashley et al., 1993; Hinds et al., 1993; Eichler et al., 1994). Trata-se de um gene altamente conservado, que apresenta 95% de homologia com gene *fmr1* do camundongo, o que torna esse animal um bom modelo para o estudo da SXF (Oostra, 1996). O *FMR1* codifica, aproximadamente, 12 tipos diferentes de RNAm, que se originam através de processamento alternativo do pré-RNAm, e se expressam em vários tecidos, sendo sua expressão maior no cérebro (Verkerk et al., 1993). Por

hibridização *in situ* foi observada a grande expressão desse gene em tecidos de camundongos, como cérebro, testículos, ovários, esôfago, timo, olhos e baço; com moderada expressão no cólon, útero, tireóide e fígado e sem expressão no coração, aorta e músculo (Hinds et al., 1993; Jin e Warren, 2000).

A mutação no *FMR1* se caracteriza pelo aumento de repetições de trinucleotídeos CGG na região 5' UTR desse gene (Fu et al., 1991; Oberté et al., 1991; Verkerk et al., 1991). Esta expansão de trincas CGG em *tandem* no primeiro exon do gene *FMR1* é o principal evento mutacional responsável pela SXF (Verkerk et al., 1991; Turner et al., 1996; De Vries et al., 1997).

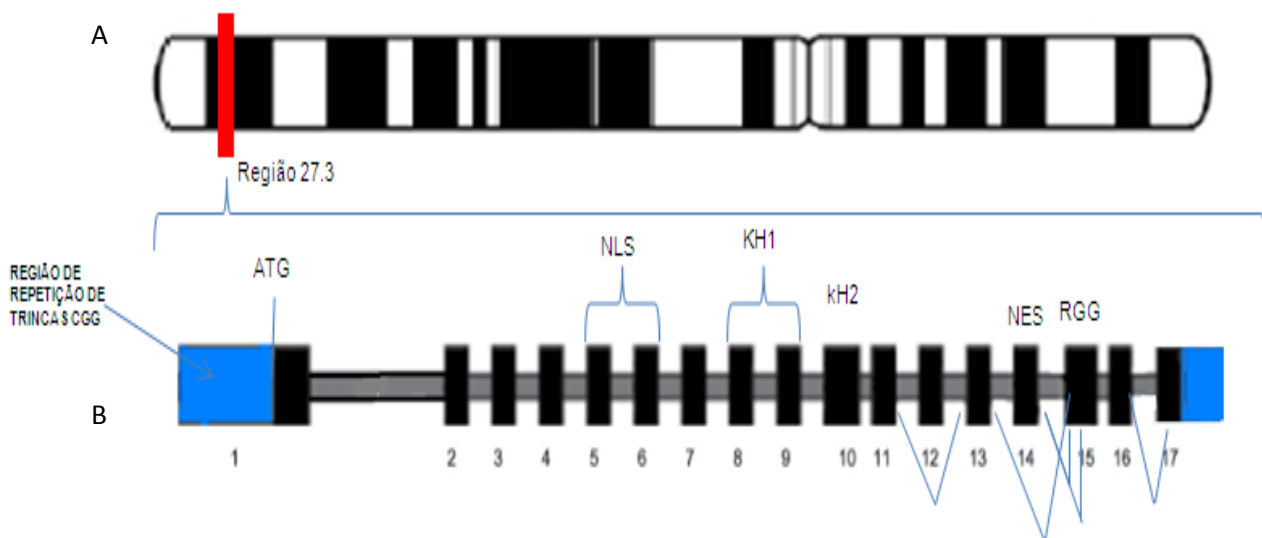


Figura 3. Desenho esquemático do gene *FMR1*. A: Cromossomo X mostrando a banda do *locus* FRAXA. B: Representação do gene *FMR1*; as partes em azul representam a regiões UTR, os segmentos em cinza representam os íntrons e aqueles em preto, os exons. O códon de início da tradução ATG, os 17 exons e as junções de *splicing* alternativo são mostrados.

Embora em algumas doenças relacionadas à expansão de trinucleotídeos as repetições estejam localizadas em regiões codificadoras do gene, no *FMR1* tais repetições estão presentes numa região não codificadora, conhecida como 5' UTR (Cummins e Zoghbi, 2000).

O número de repetições CGG é polimórfico na população. Alelos normais apresentam entre 6 e 54 trincas, sendo 30 o número de repetições mais usualmente

encontrado nos alelos (Jin e Warren, 2000; Bassell e Warren, 2008). Alelos com repetições entre 55 e 200 trincas são chamados de pré-mutados e são tipicamente encontrados em famílias com casos de SXF (Bassell e Warren, 2008). Pessoas com a síndrome possuem mais de 200 repetições CGG e, como consequência, a região promotora do gene, incluindo a região rica em CGG, é hipermetilada (Verkerk et al., 1991; Oberlé et al., 1991; Bassell e Warren, 2008) (figura 4). A metilação resulta na falta de transcrição do gene *FMR1* e, como consequência, na ausência da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) no cérebro, acarretando o quadro clínico da SXF (figura 5) (Devys et al., 1993; Verheij et al., 1993).

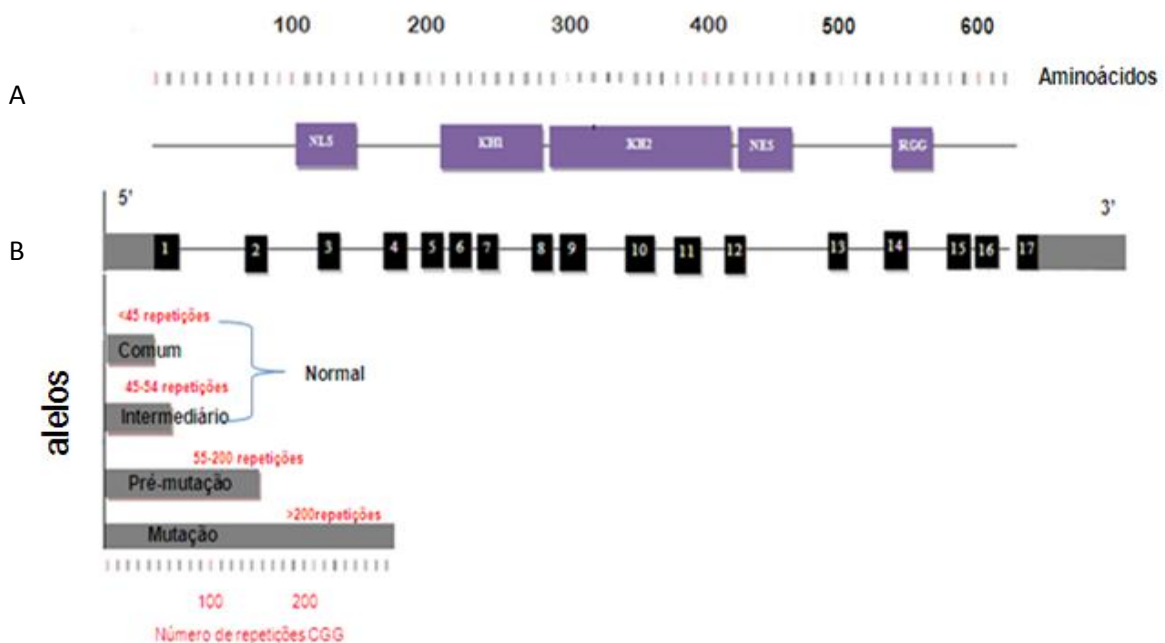


Figura 4. Proteína FMRP e gene *FMR1*. A: Domínios da proteína FMRP (roxo). Os números representam a sequência de aminoácidos. *NLS*, Sinal de Localização Nuclear; *KH1* e *KH2*, domínios de ligação de RNA; *NES*, sinal de exportação nuclear; *RGG*, ligante de RNA. B: Gene *FMR1*, exons (preto) e regiões não traduzidas (cinza). Alelos com repetições CGG na região 5' UTR. Alelos comuns e intermediários (menos de 55 repetições); alelos com pré-mutação (55-200 repetições) e alelos com mutação completa (> 200 repetições). Adaptada de Bassell e Warren, 2008.



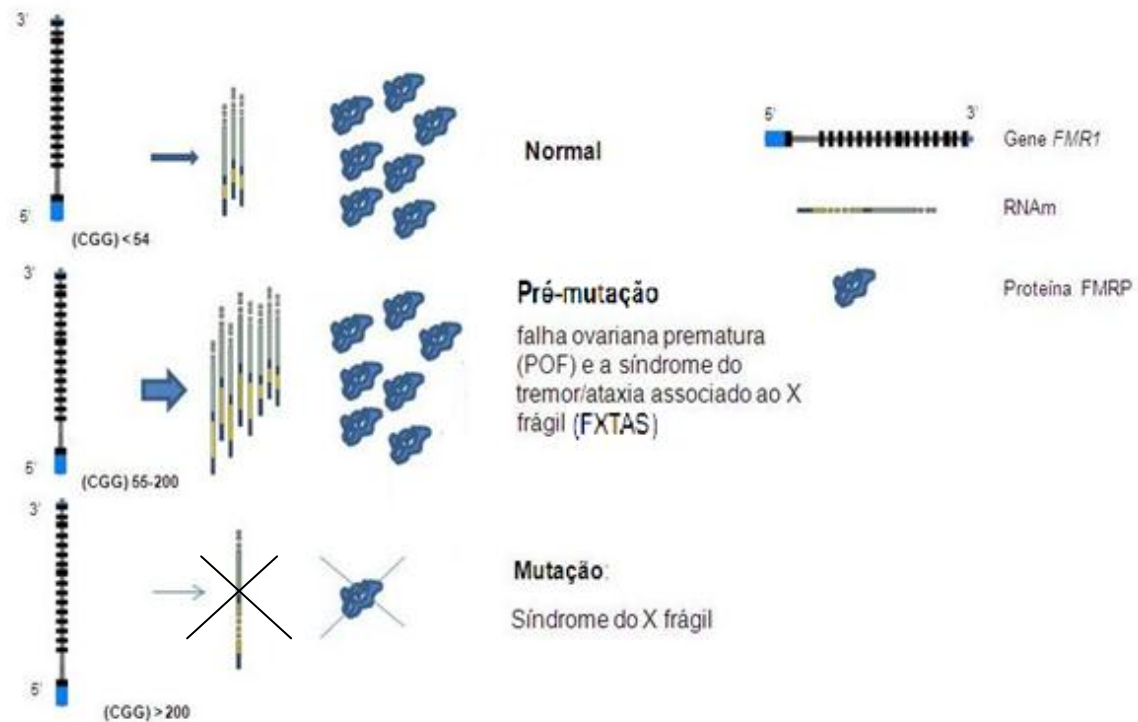


Figura 5. Esquema da transcrição e tradução do gene *FMR1* em indivíduos com alelos normais, com alelos pré-mutados e com mutação completa. Observa-se a diferença na patogênese entre a mutação completa e a pré-mutação.

Na população normal, as repetições CGG no gene *FMR1* são polimórficas, mas herdadas de maneira estável, sendo intercaladas por trincas AGG que são mais frequentemente encontradas nas posições 10 e 20 (Eichler et al., 1994; Kunst e Warren, 1994). A perda dessas interrupções AGG leva à instabilidade, acarretando maior susceptibilidade à pré-mutação, especialmente quando há mais de 30 repetições CGG. Em contraste ao alelo normal, a pré-mutação é instável e pode se expandir para a mutação completa ou para uma pré-mutação de tamanho diferente (Oberlé et al., 1991).

Alelos pré-mutados ocorrem em 1 a cada 130-250 mulheres e 1 a cada 250-800 homens, sendo assim, mais frequente em mulheres (Dawson et al., 1995; Rousseau et al., 1995; Hagerman et al., 2008). A pré-mutação não diminui a produção de proteína FMRP, mas eleva os níveis de produção de RNAm do gene *FMR1*, que atingem duas a oito vezes o normal (Tassone et al., 2000; Kenneson et

al., 2001) (Figura 5). Isto pode levar a características clínicas que os portadores de mutação completa não desenvolvem, tais como: falha ovariana prematura (POF) e a síndrome do tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS) (Hagerman, 2010). As portadoras da pré-mutação apresentam risco aumentado para surgimento de falha ovariana prematura (POF), clinicamente definida como a interrupção do ciclo menstrual antes dos 40 anos de idade. A falha na função ovariana ocorre em 21% das mulheres com a pré- mutação X frágil, ao passo que, na população geral a frequência de POF no sexo feminino é de 1%. Aproximadamente, 2% e 14% das mulheres com POF isolada ou familiar, respectivamente, são portadoras da pré-mutação (Sherman, 2000). Além dessas disfunções, alguns estudos têm associado a pré-mutação com outras patologias como doença da tireóide, hipertensão, ataques, neuropatia periférica, fibromialgia ou dor muscular crônica (Coffey et al., 2008).

Embora a expansão de trincas CGG no *FMR1* seja a principal causa da síndrome do X frágil, a literatura descreve outros tipos de alterações moleculares neste gene associadas à doença, embora de ocorrência bem mais rara: mutações de ponto, deleções de variados tamanhos (incluindo todo o gene) e rearranjos cromossômicos que afetam parte ou todo o gene *FMR1* (De Boulle et al., 1993; Wells, 2009).

As pequenas repetições em *tandem* (STRs) possuem uma taxa de mutação de até  $10^{-3}$  por geração (Heyer, 1997), em função do mecanismo conhecido como *replication slippage* em que há um “deslizamento” da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA provocando alterações no número de repetições (figura 6). Embora este mecanismo molecular de expansão de CGG não seja ainda claro, o modelo baseado na replicação em que há o *slippage* de fragmentos de Okazaki perfeitos repetidos é mais aceito como sendo responsável pela expansão da repetição. O modelo explica que a maioria dos alelos normais possui cerca de 30 repetições CGG que são interrompidas por trincas AGG. Quando a fita nascente de DNA possui mais do que 30 repetições CGGs sem a interrupção, o fragmento de Okazaki com repetições CGG tenderá a uma “derrapagem” durante a replicação, provavelmente também influenciado por uma estrutura de DNA não usual devido à repetição (Chung et al., 1993; Kunst e Warren, 1994; Eichler et al., 1996).

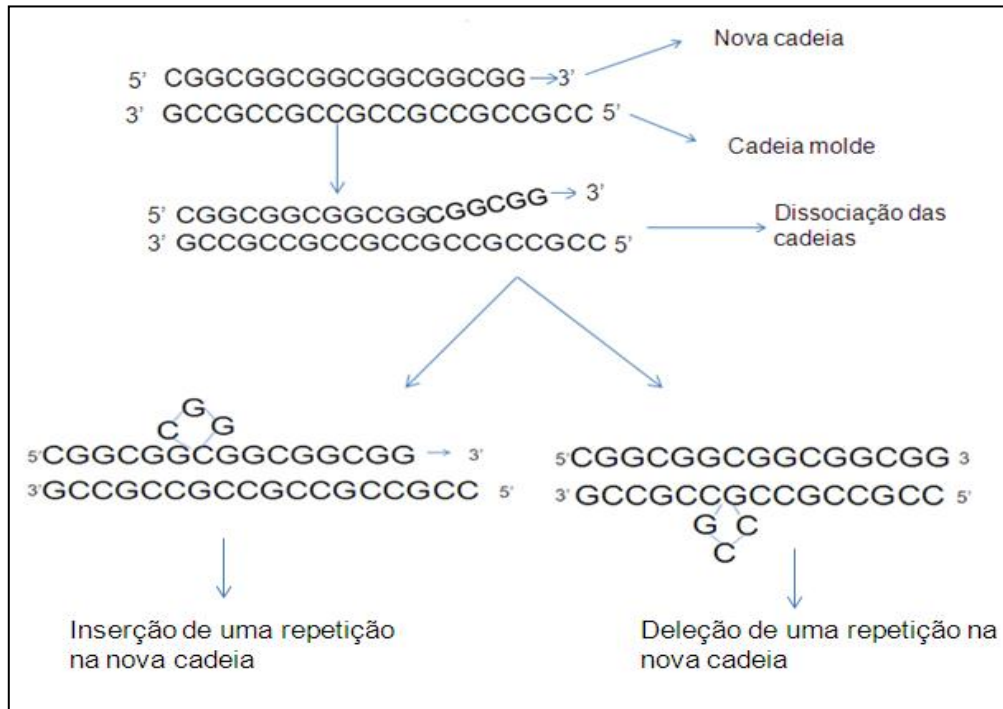


Figura 6. Aumento ou diminuição do número de repetições de marcadores STRs por *replication slippage*. (Adaptado de Hawk et al., 2005).

#### 1.1.4 A proteína FMRP

A proteína FMRP possui 632 aminoácidos e cinco domínios bem caracterizados (Rousseau et al., 2011), incluindo dois domínios de homologia a ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares humanas K (KH1 e KH2), domínio Arg-Gly-Gly (caixa RGG), sinal de localização nuclear (NLS) e de exportação nuclear (NES) (figura 4) (Bassell e Warren, 2008). Análises da sequência de aminoácidos desta proteína indicam ser ela um ligante de RNA devido aos domínios KH1, KH2, e aos *clusters* de resíduos de arginina e glicina (boxe RGG) (Ashley et al., 1993; Siomi et al., 1993).

A proteína FMRP age como repressor da tradução tanto *in vitro* como *in vivo* (Laggerbauer et al., 2001; Li et al., 2001; Mazroui et al., 2002), com seu efeito mais pronunciado nas sinapses (Zalfa et al., 2003). Contudo, não é claro como a proteína atua no processo de regulação (Laggerbauer et al., 2001; Lu et al., 2004; Stefani et

al., 2004). Muitas isoformas da FMRP são produzidas por extensivo *splicing* alternativo, sendo encontradas em diversos tecidos, e algumas delas em quantidades diferentes (Ashley et al., 1993; Khandjian et al., 1995; Verheij et al., 1995).

A proteína FMRP tem se mostrado importante em três eventos principais para as funções e desenvolvimento neuronais normais: transporte dos mRNAs do núcleo para o citoplasma, modulação da localização desses mRNAs e regulação da síntese de proteína local (Feng et al., 1997).

Uma mutação de sentido trocado (*missense*) em que há a mudança de um resíduo de isoleucina por asparagina na posição 304 da proteína FMRP (I304N) tem sido proposta estar ligada ao retardo mental grave (De Boulle et al., 1993). Esta mudança acontece no segundo domínio KH, sendo a isoleucina nesta posição bastante conservada em quase todos os domínios KH de diferentes proteínas (Siomi et al., 1994; Musco et al., 1996).

Dois homólogos autossômicos *FXR1* e *FXR2* do gene *FMR1*, têm sido identificados e suas estruturas protéicas completas são bastante similares a da proteína FMRP (aproximadamente 60% de identidade), possuindo domínios característicos de ligação a RNAs e também a capacidade de associação com ribossomos (Siomi et al., 1995; Zhang et al., 1995). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que a FMRP, FXR1P e FXR2P formam homo e heterodímeros, sugerindo que esta oligomerização possa ter importância biológica (Zhang et al., 1995). Devido a estas similaridades, as proteínas FXR1P e FXR2P podem compensar as funções da proteína quando a FMRP está ausente, tanto em humanos como em camundongos. Em células de indivíduos com X frágil e camundongos *knockout* para o gene *FMR1* verificou-se a expressão normal das proteínas FXR1P e FXR2P (Hoogeveen et al., 1997).

Estudos sobre a especificidade de ligação da proteína FMRP ao RNA têm mostrado que essa proteína se liga preferencialmente a regiões Poli (G) e Poli (U) ao invés de Poli (C) e Poli (A) *in vitro* (Jin e Warren, 2000). Além disso, a proteína apenas se liga a algumas moléculas de RNAm do cérebro *in vitro*, incluindo a região 3' UTR da proteína mielínica básica (MBP) e a do próprio mensageiro FMR1 (Brown et al., 1998). Contudo, *in vivo*, a especificidade de ligação e os alvos de RNA nativo da proteína FMRP ainda estão por ser determinados, sendo isto de muita importância para o melhor entendimento das funções fisiológicas da proteína FMRP.

Estudos apontam que os domínios proteicos KH1, KH2 e RGG sejam responsáveis pela interação com o RNA. Todavia, ao criar mutantes de deleção nas regiões N-terminal, KH e C-terminal da FMRP, apenas o primeiro domínio KH foi mostrado interagir com RNA (Adinolfi et al., 1999; Jin e Warren, 2000). A proteína FMRP também tem sido relatada em associação com polirribossomos de uma maneira dependente de RNA via partículas de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNP) (Tamanini et al., 1996; Corbin et al., 1997). Considerando o fenótipo severo dos pacientes com mutação de ponto, a associação da proteína com polirribossomos pode ser funcionalmente importante (Jin e Warren, 2000).

Estudos mostram que a proteína FMRP pode formar dímeros e que proteínas com a mutação falham em tal papel, o que sugere que a dimerização possa ser crítica para a associação da FMRP com polirribossomos (Feng et al., 1997; Lagerbauer et al., 2001).

Espinhas dentríticas anormais foram observadas tanto em pacientes com X frágil como em camundongos *knockout* para *fmr1*. Isso sugere que na maioria dos pacientes com X frágil, devido à ausência da proteína FMRP, a síntese proteica seja desregulada durante o desenvolvimento sináptico levando ao retardo mental (Hinton et al., 1991; Comery et al., 1997; Jin e Warren, 2000).

Na ausência da proteína FMRP ocorre uma desregulação da transcrição local, o que leva ao desequilíbrio no controle espacial e temporal dos níveis de proteína nos sinaptoneurossomos (Muddashetty et al., 2007). Indivíduos com SXF têm espinhas dentríticas longas, finas e imaturas (figura 7) que são similares às espinhas dentríticas de camundongos *knockout* para o gene *fmr1* (Comery et al., 1997; Grossman et al., 2006; Mineur et al., 2006; Baker et al., 2010).

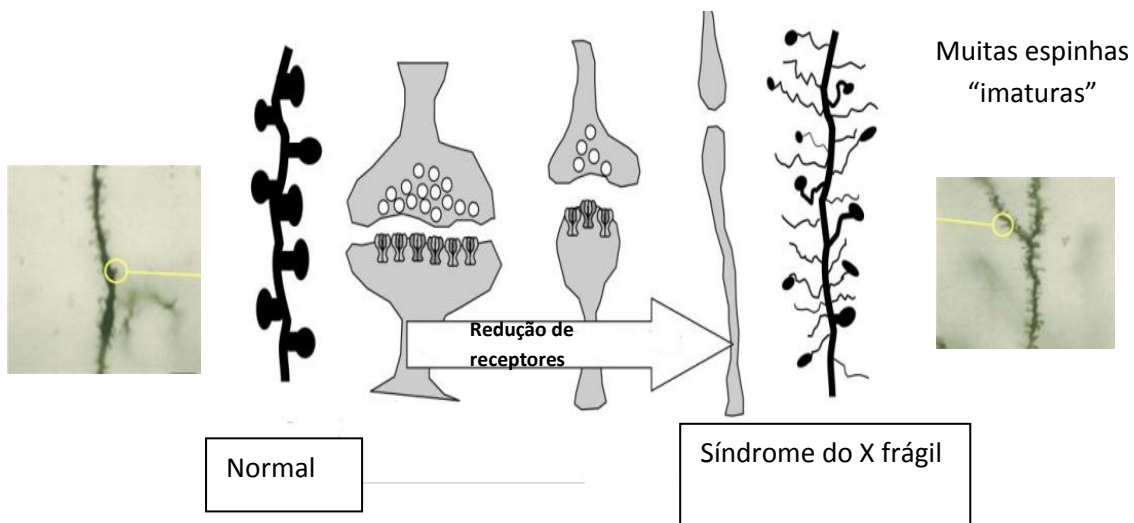


Figura 7. Redução da força sináptica nas células dendríticas na Síndrome do X frágil em relação ao normal. Figura modificada de Bear et al., 2004.

#### 1.1.5 Diagnóstico molecular

Com o advento da clonagem do gene *FMR1* e a caracterização do tipo de mutação associado à doença (Verkerk et al., 1991; Oberlé et al., 1991; Yu et al., 1991), o diagnóstico da SXF e a identificação dos indivíduos normais transmissores nas famílias, através de testes genéticos, tornou-se mais precisa (Santos, 2002).

A caracterização do tipo de mutação responsável pela SXF tem possibilitado, através do uso de testes moleculares sensíveis e específicos, o diagnóstico direto por análise do DNA, que é útil no diagnóstico diferencial do RM. Pode-se agora estimar a real contribuição da síndrome na população de deficientes mentais. Vários autores (Brown, 1996; Knight et al., 1996; Murray et al., 1996; Patsalis et al., 1999) sugerem a realização de estudos populacionais em larga escala para triagem da SXF, de forma a estabelecer a prevalência desta síndrome na população de deficientes mentais. Mesmo em países desenvolvidos da Europa, mais de 50% dos casos da doença são subdiagnosticados (De Vries et al., 1997), o que reflete a lenta introdução das novas ferramentas de diagnóstico no cuidado dos deficientes mentais. A frequência da SXF entre indivíduos com RM, estimada a partir de alguns estudos moleculares (Jacobs et al., 1993; Turner et al., 1996; Mila et al., 1997;

Aspillaga et al., 1998; Haddad et al., 1999; González-del Angel et al., 2000; Mulatinho et al., 2000; Hecimovic et al., 2002; Pandey et al., 2002; Bastaki et al., 2004; Behery, 2008; Yim et al., 2008) tem variado entre 0 e 17% e, em função dessas estimativas, novas condutas médico-educacionais têm sido adotadas em vários países (Robinson et al., 1996).

O uso do método de *Southern blot* permite a distinção dos alelos normais, pré-mutados e mutados, além de definir se está ou não ocorrendo expressão gênica. Utilizam-se duas enzimas de restrição para a digestão do DNA, sendo que uma delas deve apresentar sítios de clivagem flanqueando as repetições CGG e a outra deve ter seu sítio de restrição sensível à metilação. Embora este tipo de análise ofereça uma das mais altas performances em termos de diagnóstico (>99% de sensibilidade e 100% de especificidade), quando comparada a outros testes de DNA disponíveis (Rousseau, 1994), ele requer a utilização de material radioativo, o que limita sua aplicação como teste de rotina.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é outra técnica que tem sido utilizada para o diagnóstico da síndrome (Fu et al., 1991; Pergolizzi et al., 1992; Haddad et al., 1996). O protocolo desenvolvido por Fu e colaboradores (1991) é bastante adequado e amplamente usado para determinar o número de repetições CGG em alelos normais e pré-mutados, sendo de grande valor na identificação de indivíduos normais transmissores. Os protocolos descritos por Pergolizzi et al. (1992) e Haddad et al. (1996) apresentam alta eficiência na detecção dos alelos mutados, sendo indicado para o rastreamento de ampliações no gene *FMR1* em indivíduos do sexo masculino portadores de retardo mental de etiologia desconhecida. Contudo, o protocolo de Haddad et al. (1996) apresenta maior praticidade e rapidez em identificar alelos mutados em indivíduos do sexo masculino, pois diferentemente do método de Pergolizzi et al. (1992) não há etapa de hibridização. A limitação encontrada no protocolo de Haddad et al. (1996) é a impossibilidade de utilizar indivíduos do sexo feminino, pois, devido a mulher possuir dois cromossomos X, o método só identificaria a mutação caso a mulher tivesse os dois X mutados.

### 1.1.6 Aconselhamento genético e terapias alternativas

O aconselhamento genético é de suma importância para que todos os aspectos, envolvendo o diagnóstico, o prognóstico e os riscos de recorrência da doença sejam informados à família. A partir desse processo, ações poderão ser direcionadas, de modo que, sejam tomadas medidas adequadas relativas ao manejo dos pacientes com SXF e seus familiares (Finucane et al., 2012).

Ao identificar um indivíduo com a SXF, torna-se extremamente importante proceder à investigação de outros familiares, como forma de identificar os indivíduos portadores de alelos pré-mutados e, portanto, transmissores em potencial da síndrome. Estes devem ser informados sobre o risco de manifestação de sintomas neurológicos após os 50 anos de idade (síndrome do tremor/ataxia associada ao X frágil - FXTAS), além da possibilidade de ocorrência de falha ovariana prematura (POF) (Jacquemont et al., 2004; Hagerman, 2010).

Infelizmente, existem poucos estudos que demonstram a eficiência dos tratamentos com drogas, sendo que estes examinam a eficiência de medicamentos tradicionais que tratam os sintomas mais comuns como o déficit de atenção. A maioria dos estudos promissores destacam a terapia gênica focando a teoria do receptor de glutamato (antagonistas mGluR), contudo, grande parte desses estudos utilizam modelos animais. Praticamente nenhum estudo tem demonstrado a eficiência da combinação de intervenções educativas, psicológicas e terapêuticas no tratamento da SXF (National Institute of Health, 2008).



## 2 JUSTIFICATIVA

O retardo mental, embora não seja abordado de forma abrangente pelos órgãos responsáveis pela saúde no Brasil, constitui-se em um relevante problema de saúde pública e deve ser levado em consideração em políticas públicas de promoção à saúde, principalmente em países de baixa renda.

A contribuição da genética em relação à causa de muitas patologias começa a ter um impacto direto na prática médica, mudando rapidamente o tipo de informação que pode ser oferecido à população. Com o advento e aplicação de técnicas moleculares de diagnóstico, é crescente o número de pessoas que se beneficiam desses avanços, uma vez que, estas metodologias permitem, além da confirmação do diagnóstico clínico, pré-sintomático e pré-natal, a identificação dos indivíduos transmissores, o que abre caminho para que a medicina se torne mais preditiva e preventiva.

Em São Luís, assim como em todo o Maranhão, de acordo com o nosso conhecimento, não foram realizados estudos sobre a SXF utilizando o diagnóstico molecular em escolas especiais e hospitais psiquiátricos. Dessa forma, esse trabalho tem uma grande importância social para esta população, uma vez que poderá fornecer alguma informação sobre a incidência desta forma de deficiência mental, com perspectivas ao oferecimento de aconselhamento genético às famílias dos portadores da síndrome, em paralelo ao direcionamento de terapias específicas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar um amplo estudo molecular rastreando ampliações de sequências trinucleotídicas no gene *FMR1* em indivíduos portadores de retardo mental de causa desconhecida engajados em Programas de Educação Especial, e em Instituições psiquiátricas em São Luís-Ma.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Determinar a prevalência da SXF entre indivíduos do sexo masculino com RM inseridos em instituições de educação especial e hospitais psiquiátricos de São Luís do Maranhão;

Identificar mutações no gene *FMR1* em indivíduos portadores de RM de causa desconhecida engajados em Programas de Educação Especial, e em Instituições psiquiátricas de São Luís do Maranhão;

Descrever o perfil clínico dos indivíduos em Programas de Educação especial e Hospitais psiquiátricos em São Luís-Ma;

Identificar famílias nas quais as mutações estão segregando;

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de estudo**

Foi realizado um estudo transversal da SXF com indivíduos do sexo masculino e com retardo mental de causa desconhecida. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão sob parecer nº 348/10 (Anexo 1). Todas as condutas adotadas nesta pesquisa seguiram normas éticas do CNS/Ministério da Saúde (Resolução 196/96) que regem as pesquisas envolvendo seres humanos e tiveram início apenas após autorização formal das Instituições participantes, assim como, dos responsáveis.

### **4.2 Critérios de exclusão**

- Indivíduos com síndrome Down.
- Indivíduos com paralisia cerebral.
- Indivíduos diagnosticados com autismo grave
- Indivíduos diagnosticados com microcefalias.
- Outros diagnósticos firmados por médicos neurologistas.
- Indivíduos do sexo feminino.

### 4.3 Amostra

A amostra foi constituída por indivíduos brasileiros do sexo masculino, não aparentados, com retardo mental de causa desconhecida pertencentes a Programas de Educação Especial e Hospitais Psiquiátricos em São Luís, Maranhão. As amostras foram obtidas no período de março de 2011 a dezembro de 2011. Foram envolvidas as seguintes instituições (Quadro 1):

- Centro de Ensino de Educação Especial Padre João Mohana.
- Centro de Ensino de Educação Especial Helena Antipoff
- APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Luís
- Clínica La Ravardière de Neuropsiquiatria
- Clínica São Francisco de Neuropsiquiatria

➤ Centro de Ensino de Educação Especial Padre João Mohana

Instituição localizada em área urbana de São Luís, no bairro de Vinhais, cujo objetivo é promover a inclusão social dos alunos com retardo mental ou múltiplos transtornos invasivos do desenvolvimento e síndromes, através de ações sócio-educativas promovidas pelo atendimento educacional especializado.

Nesta instituição foram avaliados todos os indivíduos que naquele momento frequentavam a escola nos turnos matutino e vespertino que apresentavam um grau de retardo mental mais grave. Foram selecionados e avaliados 20 indivíduos nessa instituição.

➤ Centro de Ensino de Educação Especial Helena Antipoff

Instituição localizada em São Luís, no bairro Maranhão Novo, que assiste indivíduos especiais a partir de 14 anos. Trata-se de escola de estrutura física ampla, arejada e muito acolhedora. A instituição dispõe de ônibus que conduz os alunos nos dois turnos e oferece vários tipos de oficinas pedagógicas, além de quadro de professores em número adequado para interação com os alunos e seus familiares.

Foram avaliados todos os 99 alunos que, no momento da pesquisa, frequentavam a instituição e que já haviam sido diagnosticados em outras instituições como deficientes mentais de causa desconhecida.

➤ APAE – Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais de São Luís

Instituição localizada em área urbana de São Luís, no bairro do Anil. A APAE é uma instituição filantrópica que norteia suas ações baseando-se em três eixos principais: saúde, reabilitação e educação. Oferece serviços educacionais, através da Escola Especial Eney Santana, que proporciona aos seus alunos condições de ingresso em classes especiais, como atividades laborais, cursos e oficinas pedagógicas que possibilitam ao aluno desenvolver a criatividade, o senso crítico, a socialização e a inserção no mercado de trabalho. Foram avaliadas e selecionadas 85 crianças nessa instituição.

➤ Clínica La Ravardière de Neuropsiquiatria

Hospital psiquiátrico convencionado com o Sistema Único de Saúde (SUS), localizado no bairro do Olho d'água, que oferece assistência a pacientes com transtornos mentais e que receberam, em datas anteriores, alguns indivíduos com

retardo mental que foram internados jovens e, por não possuírem famílias, residem no hospital. Foram avaliados 21 indivíduos nessa instituição.

➤ **Clínica São Francisco de Neuropsiquiatria**

Hospital psiquiátrico, localizado na periferia de São Luís, no bairro Cidade Operária, conveniado com o Sistema Único de Saúde, que oferece assistência psiquiátrica para pacientes do interior e da capital. Segundo relato da assistente social, alguns pacientes residem no hospital porque perderam o vínculo com a família ou apresentam algum grau de irritabilidade e agressão.

Nesta instituição, os diagnósticos de retardo mental idiopático foram realizados pelo serviço de neurologia e psiquiatria e 13 indivíduos foram selecionados.

Quadro 1. Instituições envolvidas na pesquisa

<b>Local</b>	<b>Indivíduos</b>
<b>Centro de Ensino de Educação Especial Padre João Mohana</b>	<b>20</b>
<b>Centro de Ensino de Educação Especial Helena Antipoff</b>	<b>99</b>
<b>APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de São Luís</b>	<b>85</b>
<b>Clínica La Ravardière de Neuropsiquiatria</b>	<b>21</b>
<b>Clínica São Francisco de Neuropsiquiatria</b>	<b>13</b>

#### 4.4 Avaliação Clínica

Todos os indivíduos participantes foram previamente diagnosticados com RM. Os que eram das Escolas Especiais foram diagnosticados em ambulatórios públicos e consultórios particulares antes de serem direcionados às Escolas. Aqueles encontrados nos Hospitais conveniados ao SUS (Clínica La Ravardière e São Francisco de Neuropsiquiatria) foram diagnosticados por Neurologistas e Médicos especialistas da própria Instituição.

A avaliação clínica foi realizada pela pesquisadora sob orientação de um Médico (psiquiatra) e por uma pediatra. A ficha clínica utilizada foi padronizada pelo Serviço de Genética Humana (SERVGEN) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Anexo 3).

Para aferir os valores do volume testicular foi usado o orquímetro de Prader. Quanto às medidas das orelhas e aferição do perímetro encefálico foi utilizada fita métrica e as medidas foram baseadas em tabelas específicas.

#### 4.5 Métodos

Após a avaliação clínica, procedemos à coleta de sangue feita nas instituições, auxiliada por uma técnica de enfermagem e um bolsista de iniciação científica. De cada participante, foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA com anticoagulante, sendo o material levado ao Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão (CEPEC-MA), onde procedemos à separação do anel leucocitário (*buffy-coat*) e, posteriormente, realizamos a extração do DNA.

Tivemos dificuldades em coletar amostras de sangue de três crianças da Escola Helena Antipoffi que foram levadas ao CEPEC acompanhadas de familiares.

## 4.6 Avaliação Molecular

### 4.6.1 Extração de DNA

Os tubos com 5 mL de sangue foram armazenados a 4° C até o isolamento do anel leucocitário. Para isto, eles foram centrifugados em temperatura ambiente a 2.500 rotações por minuto (rpm) em centrífuga 5417R (EPPENDORF) durante 10 minutos. Após a centrifugação foi feita a separação do plasma e o anel leucocitário foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e armazenado a -80° até a extração de DNA.

A extração do DNA foi realizada no CEPEC-MA (Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão). Utilizando o kit de extração de DNA genômico *Illustra™ blood genomic prep mini spin* (GE Healthcare), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Foram adicionados em cada microtubo de 1,5 mL, 20 µL de proteinase, 400 µL de tampão de lise, 200 µL de sangue, e esta mistura foi deixada à temperatura ambiente e homogeneizada em vórtex intermitentemente por 10 minutos. Logo após esse período, a mistura foi transferida para uma coluna acoplada em um tubo de 2 mL e esse foi centrifugado por um minuto à temperatura ambiente a 11.000 rpm em centrífuga 5417R (EPPENDORF). O DNA extraído ficou retido na coluna e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, adicionou-se 500 µL de tampão de lise e centrifugou-se novamente a coluna por um minuto à temperatura ambiente a 11.000 rpm, descartando-se novamente o sobrenadante. Após esta etapa, foi adicionado 500 µL de *Wash buffer type 5* para a limpeza da coluna contendo o DNA. A coluna foi novamente centrifugada à temperatura ambiente por um minuto a 11.000 rpm para desprezar o sobrenadante. Em seguida, centrifugou-se à temperatura ambiente por 3 minutos a 11.000 rpm para a secagem da coluna e retirada do resíduo de etanol. Após sua limpeza, a coluna foi transferida para um novo microtubo. A este microtubo foi adicionado 200 µL do tampão de eluição EB5, previamente aquecido a 70° C, deixando-se à temperatura ambiente por um minuto seguido de centrifugação por um minuto à temperatura ambiente a 11.000 rpm. O tubo com o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado a -20° C até o momento de sua utilização e a coluna usada na extração foi descartada.



#### 4.6.2 Estimativa da concentração e da integridade do DNA

Esta etapa, bem como, as demais análises moleculares foram realizadas no SERVGEN/Departamento de Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Para avaliar a integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (INVITROGEN) diluídas em tampão TBE 1X [Tris 89 mM (USB), ácido bórico 89 mM (ISO FAR), EDTA 2mM (USB)]. No preparo das amostras, 1 µL da alíquota de DNA foi adicionado a 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,125% (SIGMA), xileno cianol 0,125% (MERCK), glicerol 15% (MERCK); 1X gelred (Biotium)] e 8 µL de água milliQ. A eletroforese foi realizada a 70 V por uma hora em cuba horizontal (Horizon 58 - INVITROGEN), usando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (USB), ácido bórico 89 mM (ISO FAR), EDTA 2mM (USB)]. O gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (modelo TM20- UVP). A qualidade do DNA foi estimada por meio de comparação com um marcador de peso molecular λ-DNA (INVITROGEN).

A concentração das amostras foi estimada por meio de espectrometria em um NanoDrop 2000 (FISHER SCIENTIFIC). Foi pipetado um microlitro de DNA para leitura da absorbância. O tampão de eluição comercial usado na extração de DNA foi utilizado como branco na calibração do equipamento. A estimativa da concentração foi calculada pelo equipamento com a configuração da quantidade de DNA de dupla fita.

#### 4.6.3 Identificação do aumento no número de repetições CGG no gene *FMR1* através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Por tratar-se de um amplo estudo, a triagem de mutações no gene *FMR1* foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase não-isotópica descrita por Haddad et al. (1996). Trata-se de um método prático e específico, sendo adequado a programas de triagem populacional.

Foram utilizados três *primers* que amplificaram uma região de 223 pb (controle interno monomórfico) e um fragmento contendo a região das repetições CGG (tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase (Haddad et al., 1996)

<i>Primers</i>	Sequência
<b>F</b>	5' -AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA- 3'
<b>U</b>	5' -CGACCTGTCACCGCCCTTCAGCCTTCC- 3'
<b>L</b>	5' -CGCTGCGGGTGTAACACTGAAACCACGTC- 3'

O detalhamento das condições da reação de amplificação utilizada consta no Quadro 2.

Quadro 2. Concentração dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase.

Reagentes	Quantidades
Tampão de reação 10X (BIOTOOLS)*	1X
MgCl <sub>2</sub> (BIOTOOLS)	2,0 mM
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP) (GE HEALTHCARE)	200 µM
dGTP (GE Healthcare)	50 µM
7-deaza dGTP (GE Healthcare )	150 µM
Oligonucleotídio L (INVITROGEN)	2,5 pmol
Oligonucleotídio F (INVITROGEN)	5,0 pmol
Oligonucleotídio U (INVITROGEN)	7,5 pmol
DNA genômico	100 ng
<i>Tth</i> DNA polimerase (BIOTOOLS)	2 U
Dimetilsulfóxido – DMSO (MERCK)	10%
Triton X-100 (USB)	0,1%
Volume Final	25 µL

\* (Tris-HCl 75 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 20 mM – BIOTOOLS)

As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador PTC 100 (MJ RESEARCH) com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos; 5-10 minutos a 72°C para adição da enzima *Tth* DNA polimerase; 35 ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 1,5 minutos, anelamento a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos resultantes da amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida 5% corado pelo método de Santos et al. (1993). Através desta metodologia, os indivíduos que apresentarem amplificação de repetições CGG no gene *FMR1* na faixa de mutação completa serão identificados pela ausência de amplificação do fragmento referente ao *locus* FRAXA, já que alelos contendo um alto número de repetições CGG (>200) são refratários à ação da enzima *Tth* DNA polimerase (Figura 8).

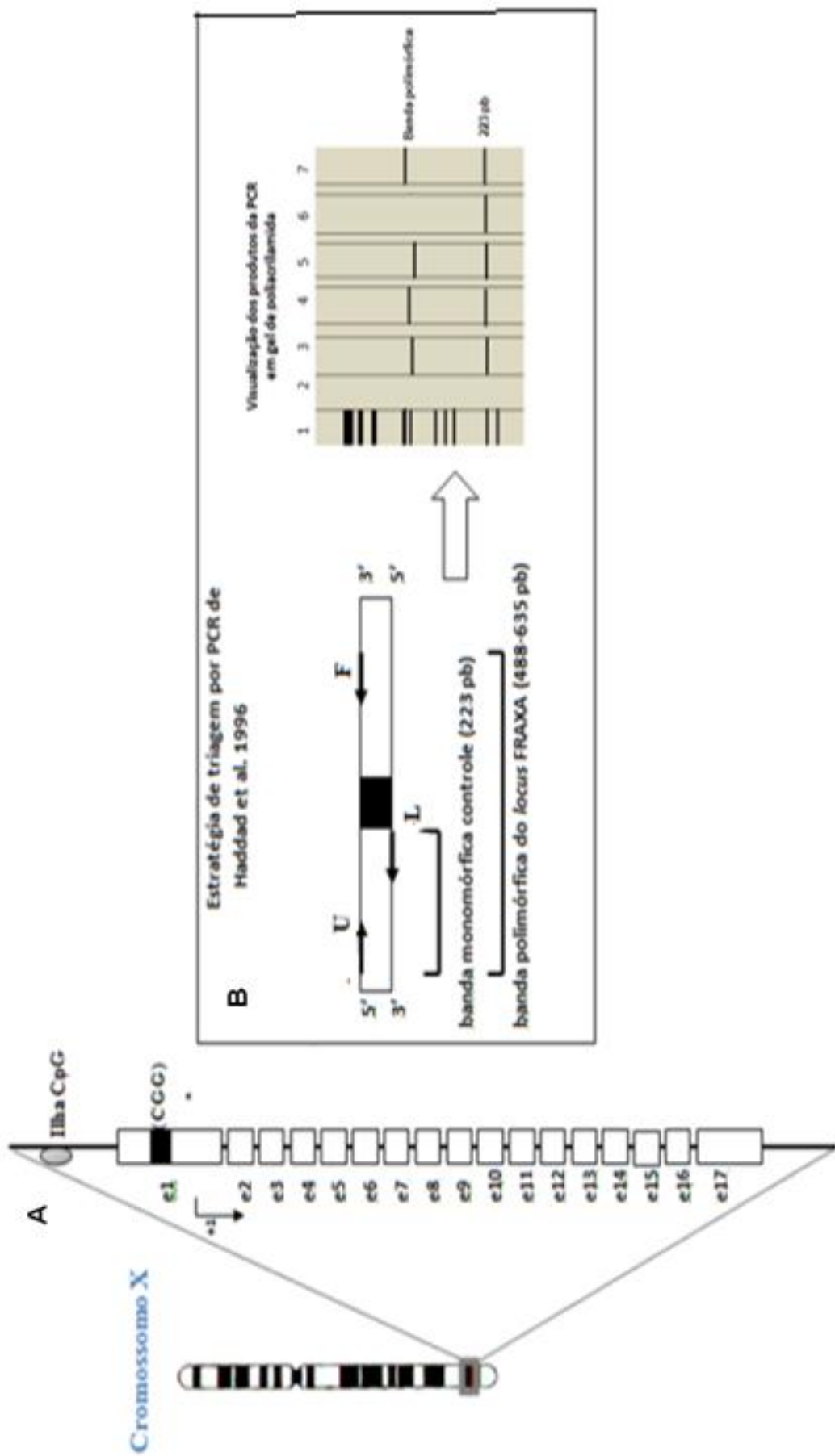


Figura 8. A. Esquema do gene *FMR1*. B. Estratégia de triagem por PCR segundo Haddad e colaboradores (1996).

#### 4.6.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento automático do produto da PCR foi conduzida apenas em uma situação, como uma análise complementar.

Após a amplificação, 20  $\mu\text{L}$  do produto da PCR foram purificados para a remoção de resíduos de oligonucleotídeos, dNTPs, enzima, DNA genômico e componentes do tampão que não foram utilizados na reação de PCR. Nesse procedimento utilizou-se o Kit de purificação [AccuPrep® PCR Purification Kit (BIONEER)], seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

A reação de sequenciamento foi preparada em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando-se o Kit Big Dye Terminator v3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS), contendo: 1,0  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo senso U (tabela 2) a 3,2  $\mu\text{mol}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  de tampão (APPLIED BIOSYSTEMS), 1,0  $\mu\text{L}$  (cerca de 60  $\eta\text{g}$ ) do DNA purificado e 0,5  $\mu\text{L}$  do Kit Big Dye Terminator (APPLIED BIOSYSTEMS). A reação foi conduzida no termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) e as condições de ciclagem utilizadas foram: 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Para a precipitação da reação de sequenciamento, foram adicionados à reação 80  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% (MERCK). A placa foi deixada à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 3.000 rpm por 50 minutos (centrífuga de placas SIGMA 2-16P). Após a centrifugação, a placa foi invertida em um papel toalha, que logo após foi retirado, sendo outro papel colocado abaixo da mesma. A placa invertida foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto. Para a secagem, a placa foi colocada em um termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) por 5 minutos a 75°C e posteriormente mantida à -20°C. Para a aplicação no sequenciador, foi adicionado à reação 10  $\mu\text{L}$  de solução de formamida [Hi Di Formamida (APPLIED BIOSYSTEMS)] e a placa foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto.

A placa contendo a reação de sequenciamento juntamente com a formamida foi levada ao termociclador Veriti modelo 9902 (APPLIED BIOSYSTEMS) por 5 minutos a 95°C para a desnaturação e, imediatamente, incubada em gelo para permitir a manutenção da desnaturação da amostra. A reação foi processada em um

sequenciador automático ABI Prism 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS) na Plataforma Genômica do IBRAG/UERJ.

#### 4.6.5 Análise das sequências

Para a avaliação do eletroferograma gerado pelo o sistema de sequenciamento utilizou-se o programa Chromas Lite Versão 2.0 (TECHNELYSIUM), que encontra-se no endereço eletrônico "<http://www.technelysium.com.au/>". Para o alinhamento das sequências com suas respectivas sequências selvagens utilizou-se o programa Bioedit sequence Alignment Editor versão 7.0.5.2 (05/06/05) (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.), disponível no endereço eletrônico: "<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>".

## 5 RESULTADOS

Nossa amostra foi composta por 238 indivíduos com retardo mental do sexo masculino, não aparentados (faixa etária: 4 a 60 anos; média =  $21 \pm 9$  anos). Entre os probandos, 157 (66,1%) nasceram em São Luís-MA, 66 (27,7%) no interior do Estado do Maranhão e 15 (6,2%) em outros Estados. O Quadro 3 apresenta a relação dos indivíduos participantes desse estudo, bem como, o resultado da análise molecular do gene *FMR1* conduzida, em que 235 (98,74%) foram normais, 2(0,84%) positivos e 1(0,42%) inconclusivo.

Quadro 3. Indivíduos participantes da análise molecular do gene *FMR1*.

NÚMERO	IDENTIFICAÇÃO	IDADE (anos)	REGISTRO	PCR do gene <i>FMR1</i>
1	ALSS	22	3495	N
2	ARLS	21	3496	N
3	JAP	38	3497	N
4	ASF	24	3498	N
5	LSC	21	3499	N
6	NLLS	22	3500	N
7	MSR	17	3501	N
8	JSS	23	3502	N
9	MSF	19	3503	P
10	IEP	17	3504	N
11	BFAM	22	3505	N
12	RMO	23	3506	N
13	ECL	24	3507	N
14	DBC	32	3508	N



15	LFFA	46	3509	N
16	TGR	22	3510	N
17	RSL	21	3511	N
18	JPB	25	3512	N
19	WJM	28	3513	N
20	JAMB	23	3514	Inc
21	AS	24	3515	N
22	GCRS	27	3516	N
23	LSSA	32	3517	N
24	MSP	21	3518	N
25	MP	19	3519	N
26	LFSM	16	3520	N
27	RRRF	17	3521	N
28	DJAG	20	3522	N
29	ESSS	18	3523	N
30	ASR	24	3524	N
31	LSS	19	3525	N
32	JVP	21	3526	N
33	RCS	25	3527	N
34	PRPC	25	3528	N
35	JRGC	20	3529	N
36	WVTS	19	3530	N
37	GMM	16	3531	N
38	WJFM	18	3532	N
39	DSS	25	3533	N
40	TPDA	18	3534	N
41	IOJ	22	3535	N
42	GASB	21	3536	N
43	OSC	20	3537	N

44	CRPDJ	25	3538	N
45	ACCS	17	3539	N
46	MPF	17	3540	N
47	ANS	23	3541	N
48	JVS	16	3542	N
49	JABS	17	3543	N
50	NCR	17	3544	N
51	SGCNR	20	3545	N
52	CVMJ	22	3546	N
53	KPH	18	3547	N
54	GMRS	18	3548	N
55	TMRS	16	3548-A	N
56	ASC	21	3549	N
57	FRF	25	3550	N
58	MPF	25	3551	N
59	CJL	29	3552	N
60	JPJ	19	3553	N
61	MSM	28	3554	N
62	KM	15	3555	N
63	TSL	17	3556	N
64	LBS	18	3557	N
65	FSN	22	3558	N
66	TCS	19	3559	N
67	RNG	27	3560	N
68	HMSG	16	3561	N
69	FCC	17	3562	N
70	FER	23	3563	N
71	RRBCL	16	3564	N
72	EP	19	3565	N

73	JAL	17	3566	N
74	GAP	15	3567	N
75	AFPP	22	3568	N
76	AMF	25	3569	N
77	IRRS	24	3570	N
78	ARM	22	3571	N
79	VSC	23	3572	N
80	ALAS	22	3573	N
81	RNL	25	3574	N
82	MAMN	18	3575	N
83	FQSR	15	3576	N
84	CMBS	15	3577	N
85	DLPS	19	3578	N
86	BCS	23	3579	N
87	HLPS	22	3580	N
88	ROC	18	3581	N
89	LFFA	18	3582	N
90	FRS	19	3583	N
91	MDN	23	3584	N
92	MHC	18	3585	N
93	LSN	17	3586	N
94	RC	20	3587	N
95	JML	24	3588	N
96	IYMS	23	3589	N
97	JJCN	18	3590	N
98	MSR	17	3591	N
99	JRFS	23	3592	N
100	WJCS	22	3593	N
101	JSD	29	3594	N

102	PRS	12	3595	N
103	VGIA	24	3596	N
104	PHCB	23	3597	N
105	RMFC	7	3598	N
106	VCP	11	3599	N
107	VSP	8	3600	N
108	GTS	6	3601	N
109	LMMC	4	3602	N
110	VPV	22	3603	N
111	MCMR	6	3604	N
112	PASN	10	3605	N
113	GPS	10	3606	N
114	CL	4	3607	N
115	FTBS	10	3608	N
116	ACS	9	3609	N
117	GCBG	12	3610	N
118	FHRN	28	3611	N
119	ASCM	34	3612	N
120	DSM	11	3613	N
121	GSN	32	3614	N
122	JRRM	38	3615	N
123	NGB	60	3616	N
124	DG	23	3617	N
125	RNCA	31	3618	N
126	MS	28	3619	N
127	JRPS	26	3620	N
128	MR	24	3621	N
129	WM	28	3622	N
130	NMD	24	3623	N

131	CGL	11	3624	N
132	PFA	28	3625	N
133	CJBC	39	3626	N
134	JRRB	10	3627	N
135	VCC	38	3628	N
136	HC	22	3629	N
137	JAC	11	3630	N
138	NL	20	3631	N
139	LRC	34	3632	N
140	EOL	29	3633	N
141	WG	23	3634	N
142	CS	21	3635	N
143	GST	7	3636	N
144	JAS	30	3637	N
145	JAL	37	3638	N
146	RAB	37	3639	N
147	LCCF	27	3640	N
148	ACA	30	3641	N
149	FAC	32	3642	N
150	GPJ	40	3643	N
151	ADS	42	3644	N
152	NS	38	3645	N
153	RNSP	49	3646	N
154	TPF	36	3647	N
155	JDN	36	3648	N
156	JCC	21	3649	N
157	WJFMJ	18	3650	N
158	JWSG	12	3651	N
159	WAFJ	11	3652	N

160	JBN	10	3653	N
161	RDC	25	3654	N
162	MFC	12	3655	N
163	DAB	12	3656	N
164	PMM	20	3657	N
165	SJBSRJ	20	3658	N
166	ABSP	22	3659	N
167	LJMB	19	3660	Del ~197 pb
168	JRMS	39	3661	N
169	WSS	10	3662	N
170	BCC	13	3663	N
171	JCS	24	3664	N
172	SWO	23	3665	N
173	CSS	21	3666	N
174	MESO	27	3667	N
175	HGC	31	3668	N
176	RSS	21	3669	N
177	EMN	10	3670	N
178	CJGBJ	14	3671	N
179	RLC	21	3672	N
180	JSA	9	3673	N
181	WLAM	25	3674	N
182	LLL	27	3675	N
183	ACS	9	3676	N
184	GMS	15	3677	N
185	DAS	10	3678	N
186	JVOL	11	3679	N
187	ADMD	21	3680	N
188	ISA	11	3681	N

189	FJVL	16	3682	N
190	CJCS	13	3683	N
191	DAS	10	3857	N
200	GRC	20	3866	N
201	DFSM	9	3867	N
202	IMN	18	3868	N
203	TVCB	13	3869	N
204	ESO	42	3870	N
205	ADFA	9	3871	N
206	GMA	18	3872	N
207	JMS	26	3873	N
208	GTP	10	3874	N
209	ECF	11	3875	N
210	YGCS	7	3876	N
211	JPSJ	9	3877	N
212	MVCN	5	3878	N
213	JBN	27	3879	N
214	WASC	19	3880	N
215	RSS	21	3881	N
216	RCS	20	3882	N
217	DSC	21	3883	N
218	JMA	17	3884	N
219	FPR	18	3885	N
220	WAS	8	3886	N
221	EJS	29	3887	N
222	LMS	35	3888	N
223	DP	17	3889	N
224	MJC	27	3890	N
225	RLCS	10	3891	N

226	CLGT	22	3892	N
227	GVS	9	3893	N
228	WSN	10	3894	N
229	HLS	50	3895	N
230	LTS	11	3896	N
231	GGSO	10	3897	N
232	CTLSF	10	3898	N
233	ASN	17	3901	N
234	EJSM	17	3902	N
235	LCSV	23	3903	N
236	GCS	9	3904	N
237	MOS	11	3905	N
238	JSSP	7	3906	N

N= normal

P= positivo (com amplificação de trincas CGG)

Inc= resultado inconclusivo

Del= mutação do tipo deleção

Na Tabela 3, apresentamos o resumo dos resultados encontrados em relação à análise molecular do gene *FMR1* conduzida nos 238 probandos.



Tabela 3. Resultados quanto à análise molecular do gene *FMR1* nos indivíduos com RM avaliados.

Categoria	N (%)	Tipo de mutação
Indivíduos sem mutações	235 (98,74)	-
Indivíduos com mutações	2 (0,84)	amplificação de trincas CGG (1) deleção (1)
Caso inconclusivo	1 (0,42)	-
Total	238	

Dentre os casos avaliados, apenas o indivíduo 3514 apresentou resultado inconclusivo em relação à análise molecular do gene *FMR1*, após a PCR ter sido repetida em três ocasiões diferentes (Quadro 3). Provavelmente, isso ocorreu em função da má qualidade do DNA e não foi possível coletar uma nova amostra de sangue do probando.

Todos os demais indivíduos foram rastreados com sucesso quanto à presença de mutações dinâmicas no gene *FMR1* e, em sua maioria, apresentaram repetições CGG na faixa de normalidade (Quadro 3 e Tabela 3). Foram encontradas alterações em dois casos (Quadro 3): o indivíduo 3503 apresentou repetições de trincas CGG no *locus* FRAXA na faixa de mutação completa, ou seja, >200 (figura 9) e o indivíduo 3660 apresentou uma banda incomum no gel, sugestiva de deleção no exon 1 do gene *FMR1*, envolvendo a região das trincas CGG (Figura 10). Após o sequenciamento do amplicon neste probando, foi possível confirmar a presença de uma deleção de ~197 pb envolvendo parte das repetições CGG e uma região proximal às trincas (Figura 11).



Figura 9. Gel de poliacrilamida 5% com os produtos da PCR de 4 indivíduos analisados. Entre eles, o probando 3503 (linha 5) no qual identificamos a presença da amplificação de repetições CGG no gene *FMR1*.

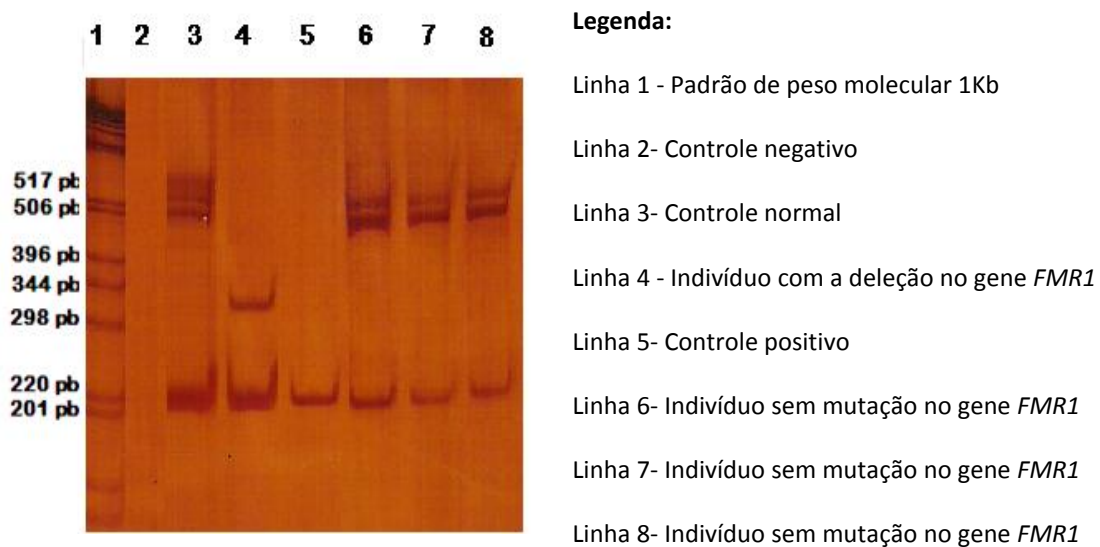


Figura 10. Gel de poliacrilamida 5% com os produtos da PCR de 6 indivíduos analisados. Entre eles, o probando 3660 (linha 4) no qual identificamos um padrão de bandas sugestivo de deleção no gene *FMR1*.





Figura 12. Foto do indivíduo 3503 portador da SXF, que apresenta expansão de trincas CGG no gene *FMR1*. Foto exibida com autorização da mãe.

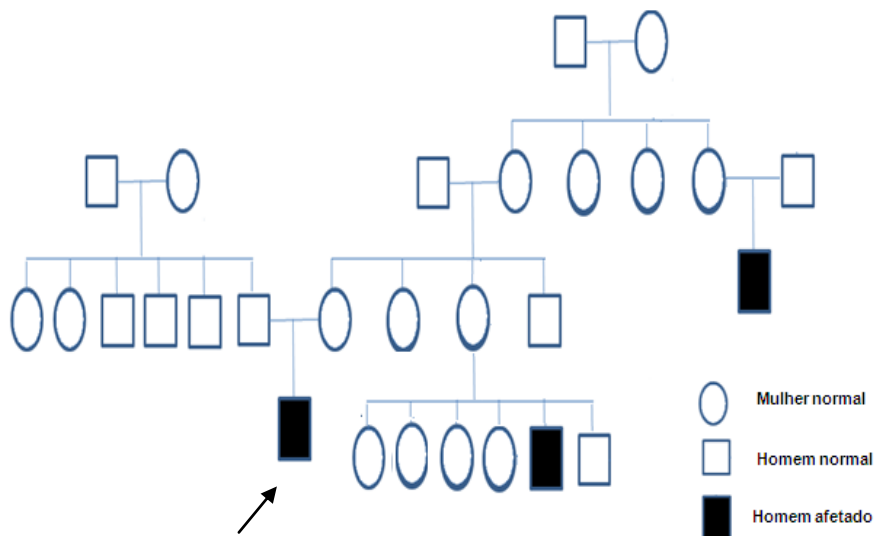


Figura 13. Heredograma do probando 3503 (seta). Em preto estão dois outros indivíduos com retardo mental, ambos do sexo masculino.

Segundo relato da tia, o indivíduo 3660 (Figura 14) nasceu de parto eutócico (normal) em 25/12/1992, sendo diagnosticado por neurologista da APAE como portador de RM, apresentando fala repetitiva, perímetro encefálico proeminente, *pectus excavatum*, macroorquidismo, contato pobre com os olhos e orelhas grandes. Frequenta escola especial desde os sete anos de idade. Filho único de mãe com RM leve e pai com sinais de problemas psiquiátricos, em seu heredograma (Figura 15) observa-se uma nítida história de RM ligado ao X. Dois tios maternos também possuem a condição.



Figura 14. Foto da família do indivíduo 3660, portador da deleção no gene *FMR1* (seta). Pode-se observar fenótipo típico da SXF. Tio (lado direito) com retardo mental. Foto exibida com permissão do pai do menino.

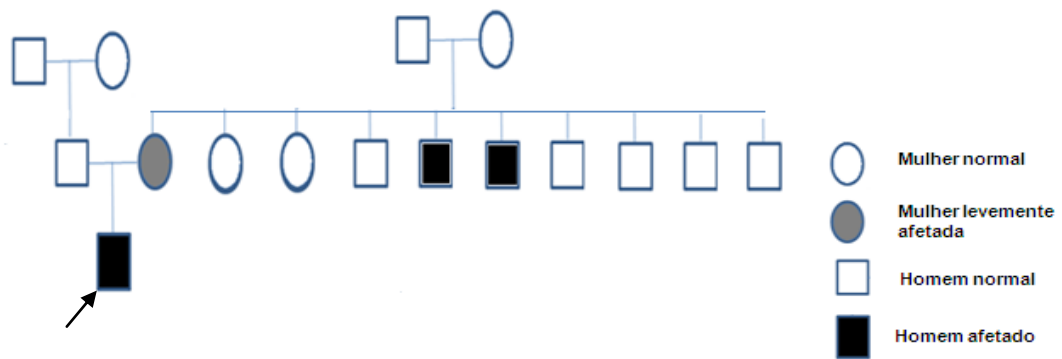
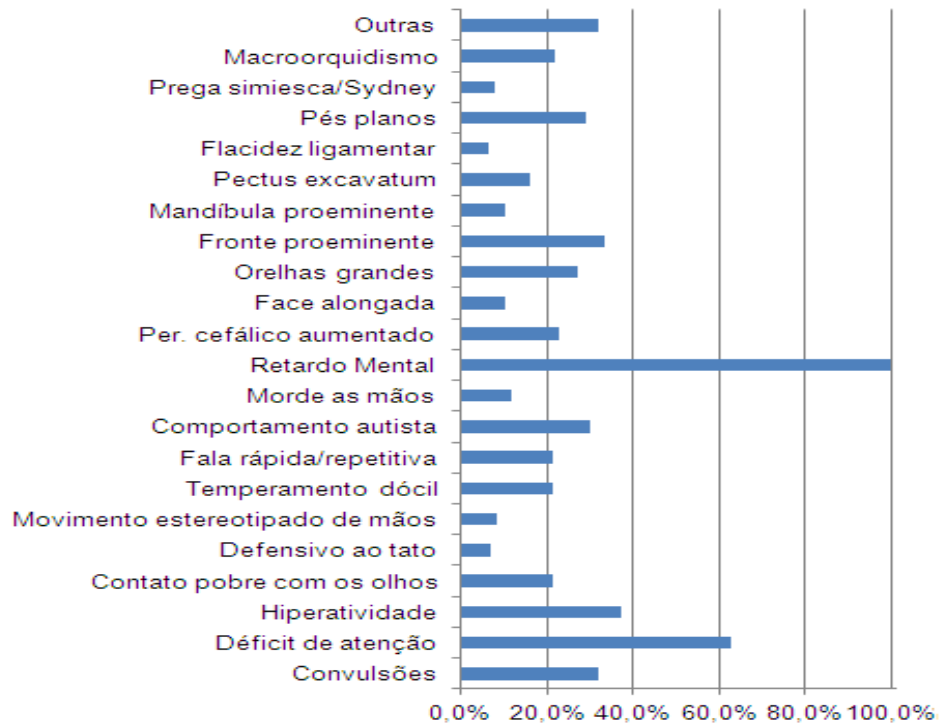


Figura 15. Heredograma do indivíduo 3660 (seta). Em preto estão os indivíduos com retardo mental e em cinza aqueles com retardo mental leve.

Quanto às características clínicas, além do retardo mental, os probandos apresentavam déficit de atenção 149 (62,6%) e características como hiperatividade, fronte proeminente, convulsões, comportamento autista e pés planos, representando 89 (37,4%), 80 (33,6%), 76 (31,9%), 71 (29,8%) e 69 (29%), respectivamente. (gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição das características clínicas, físicas e comportamentais, mais frequentemente observadas nos indivíduos analisados para SXF.



A tabela 4 lista os fenótipos dos dois probandos com mutações no gene *FMR1*.

Tabela 4. Características clínicas dos indivíduos que apresentam mutações no gene *FMR1*

<b>Fenótipo</b>	<b>Expansão CGG</b>	<b>Deleção</b>
<b>Indivíduo</b>	<b>(3503)</b>	<b>(3660)</b>
Hiperatividade		X
Contato pobre com os olhos		X
Temperamento dócil	X	
Retardo Mental	X	X
Orelhas grandes	X	X
Mandíbula proeminente	X	X
<i>Pectus excavatum</i>		X
Macroorquidismo		X
Pouca comunicação		X
Flacidez ligamentar	X	

As famílias de ambos os probandos com mutações FRAXA foram informadas e esclarecidas em relação ao diagnóstico da doença.

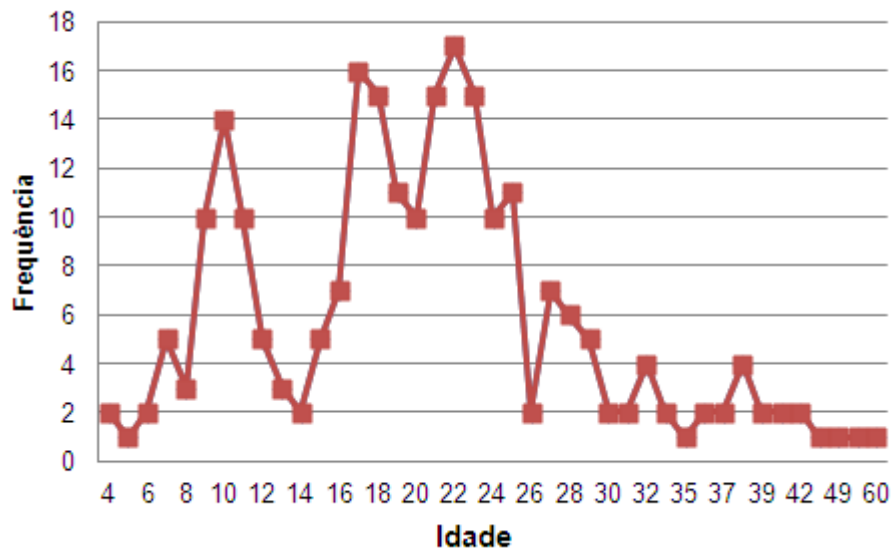


## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado na capital de um dos Estados mais pobres do Brasil (IBGE, 2007), Maranhão, de modo a se obter informações sobre a etiologia do retardo mental em 238 indivíduos do sexo masculino, não aparentados, atendidos em escolas e instituições especializadas. Foi observado que a maioria dos probandos era da capital São Luís (66,1%), contudo um percentual significativo nasceu no interior do Estado (27,7%) e 6,2% deles eram de outros Estados, indicando que o interior do Maranhão não oferece locais especializados para o acompanhamento desses indivíduos.

Embora reconhecida como a principal causa de RM hereditário (Turner et al., 1996; De Vries et al., 1998; Kooy et al., 2000), a SXF ainda é uma doença subdiagnosticada no Brasil. No Maranhão, de acordo com nosso conhecimento, não existem estudos a respeito desta síndrome, excetuando-se o trabalho de Mingroni-Netto et al. (2002), que estudou a variabilidade das repetições CGG do gene *FMR1* em populações sul-americanas, nas quais se encontrou uma maior frequência de alelos com 30 repetições CGG em indivíduos afro-brasileiros (incluindo duas comunidades do Maranhão), ameríndios e euro-brasileiros.

Em nosso estudo, observa-se uma grande variabilidade de idades entre os indivíduos com RM triados, sendo a maioria deles com idade superior a 17 anos (64%) (Gráfico 3), o que demonstra uma expressiva carência de programas no Estado do Maranhão voltados para o diagnóstico das causas de deficiência mental e, por consequência, a falta de intervenções clínicas e/ou educacionais para os indivíduos com RM e suas famílias. Sabe-se que quão mais cedo forem conduzidas essas intervenções, em paralelo ao aconselhamento genético, melhor será a qualidade de vida da família como um todo. Crawford et al. (2002) relataram que cerca de 1/3 das crianças identificadas com a SXF não são diagnosticadas antes dos 10 anos de idade. Deste modo, destacamos a grande contribuição de nosso trabalho ao oferecer subsídio para a estruturação de um protocolo molecular de triagem para a SXF, adequado à realidade do nosso Estado.



Entre as intervenções que poderiam ser feitas inclui-se o diagnóstico clínico voltado para a identificação da SXF; programas de conscientização sobre a doença, que dariam foco à importância da identificação de portadores dessa síndrome, levando em consideração a história de RM na família e os sintomas mais comuns encontrados. A inclusão deste transtorno como parte de rotina no cuidado pós-natal do recém-nascido é de suma importância, pois melhoraria a identificação dos sinais e sintomas ainda quando criança (McConkie-Rosell et al., 2005).

Foram encontrados dois casos (0,84%) com mutação no gene *FMR1* em nosso trabalho. O indivíduo 3503 apresentou mais de 200 repetições de trincas CGG no *locus* FRAXA e o indivíduo 3660 apresentou uma deleção de cerca de 197 pb envolvendo parte das repetições CGG e uma região proximal às repetições CGG. Ambos os probandos tinham mais de 18 anos, o que evidencia o diagnóstico tardio da condição nesses indivíduos e reforça a necessidade da implementação de programas eficientes para o diagnóstico precoce da SXF no Estado do Maranhão.

Aproximadamente, 95% dos casos da SXF são devidos à expansão de trincas CGG no gene *FMR1* (Penagarikano et al., 2007). Contudo, inúmeros estudos descrevem mutações em *FMR1* por deleção da região de repetições CGG e sequências adjacentes (Quan et al., 1995; Schmucker et al., 1996; Wolff et al., 1997; Gronskov et al., 1997; Garcia Arocena et al., 2000; Fan et al., 2005). Estas deleções variam desde um único par de bases a até aproximadamente 13

megabases de DNA e envolvem tanto o gene *FMR1* como as regiões flangeadoras (Wolff et al., 1997). As pequenas deleções, em geral, ocorrem devido à instabilidade de repetições CGG (Hammond et al., 1997; Petek et al., 1999; Han et al., 2006) e, na maioria das vezes, coexistem com alelos mutados e pré-mutados, sendo que estas pequenas deleções ocorrem durante a transmissão gênica de mãe para filho na meiose (Garcia Arocena et al., 2000; Gasteiger et al., 2003; Fan et al., 2005; Han et al., 2006). Provavelmente muitos fenótipos da SXF podem ser decorrentes do mecanismo de deleção, mas torna-se difícil um diagnóstico preciso já que a maioria das técnicas usadas na triagem avalia apenas a região gênica que contém as repetições CGG (Wells, 2009).

Em relação aos indivíduos 3503 e 3660, identificados como portadores de mutações no gene *FMR1* relacionadas à SXF, entendemos que a investigação molecular nas respectivas famílias será de suma importância para acompanhar a segregação dos alelos mutados nas duas genealogias.

O indivíduo 3503, com expansão de trincas CGG no gene *FMR1*, possui características faciais comuns aos casos de SXF. As características encontradas foram déficit de atenção, temperamento dócil, mandíbula proeminente, orelhas grandes e flacidez ligamentar. Por outro lado, o indivíduo 3660, portador da deleção no gene *FMR1*, possui duas características em comum com o indivíduo 3503, que são a mandíbula proeminente e as orelhas grandes. Além dessas, ele apresenta também hiperatividade, contato pobre com os olhos, *pectus excavatum*, macroorquidismo e pouca comunicação. Assim, observa-se a heterogeneidade fenotípica entre os dois casos positivos para a SXF, o que constitui uma característica da doença, que muito dificulta o diagnóstico somente em termos clínicos. Avalia-se que 25 a 30% dos portadores de SXF não apresentam a fácies típica da síndrome (Terracciano et al., 2005). Assim, ainda que o fenótipo clínico não seja indicativo, a investigação molecular em indivíduos com RM de causa desconhecida, principalmente naqueles com história familiar de deficiência mental, justifica-se.

Pesquisas para estimar a prevalência da SXF em diversas populações são importantes para nosso entendimento sobre a doença, embora comparações entre elas devam ser feitas com cautela em função dos diversos procedimentos utilizados na seleção dos pacientes e da diversidade de protocolos de análise molecular. A Tabela 5 apresenta dados referentes a alguns estudos em comparação ao nosso.

Tabela 5. Estimativa de prevalência da síndrome do X frágil em indivíduos com deficiência mental de diferentes populações.

País	Nº testado		Nº positivo	(%)	Referência
	Homens	Mulheres			
Brasil	38	47	0	0	Mulatinho et al., 2000
Brasil	256	0	5	2,0	Haddad et al., 1999
<b>Brasil</b>	<b>238</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0,84</b>	<b>Nosso estudo, 2013</b>
Kuwait	182	0	20	11	Bastaki et al., 2004
Croácia	73	41	3	2,6	Hecimovic et al.,2002
Coreia	52	13	4	6,2	Yim et al., 2008
Coreia	78	23	1	0,99	Kwon et al., 2001
Egito	200	0	34	17	Behery, 2008
Índia	118	28	3	2,5	Pandey et al.,2002
Espanha	182	0	11	6,0	Milà et al.,1997
Chile	214	86	4	1,9	Aspillaga et al.,1998
Reino Unido	180	74	4	2,2	Jacobs et al., 1993
Austrália	472	0	10	2,1	Turner et al., 1996
México	53	9	2	3,8	González-del Angel et al., 2000

A prevalência da SXF em nossa amostra, 0,84%, embora relativamente baixa, encontra-se na faixa de incidência de casos diagnosticados em outras populações que, em sua maioria, relatam incidências variando de 0 a 3%, conforme mostrado na tabela 5.

Os estudos de Haddad et al. (1999) e Mulatinho et al. (2000), ambos realizados no Brasil em instituições para indivíduos com RM, investigaram amostras de 256 e 85 indivíduos, respectivamente. O estudo de Haddad et al. (1999) foi o que mais se assemelhou ao nosso trabalho, tanto em relação ao tamanho amostral como pelo fato de terem analisado apenas indivíduos do sexo masculino. No trabalho realizado por Mulatinho et al. (2000), além da pequena amostra, ela era composta por indivíduos de ambos os sexos (47 mulheres e 38 homens). Além disso, os

autores não dispunham de informações sobre a história familiar de RM dos probandos.

Os estudos que identificaram prevalências mais elevadas (Milà et al., 1997; Bastaki et al., 2004; Yim et al., 2008; Behery, 2008), quando da triagem de suas amostras, afastaram outras causas ambientais e genéticas importantes de deficiência mental. Eles também utilizaram checklists, pontuando as principais características clínicas e comportamentais associadas à condição, bem como, classificaram os probandos em relação à existência ou não de outros casos de RM na família. Em se tratando de uma doença genética, sem dúvida, o histórico familiar é de grande importância. No estudo realizado no Egito com 200 indivíduos com RM encontrou-se uma prevalência significativamente alta da SXF (17%), sendo que mais da metade dos probandos incluídos nesta investigação (63%) tinha história familiar de RM (Behery et al., 2008).

Em nosso estudo, através da análise dos heredogramas (Figuras 13 e 15), podemos observar que ambos os indivíduos com mutações em *FMR1*, ou seja, positivos para SXF, possuem história familiar de RM, com outros parentes com deficiência mental, sendo o padrão de segregação do RM nos dois heredogramas típico de uma condição ligada ao X. Isso demonstra que a história de RM na família também constitui uma característica importante na seleção de casos a serem triados para a SXF (McConkie-Rosell et al., 2005; Bailey et al., 2008). Lamentavelmente, essa informação não constava dos registros das instituições participantes de nosso estudo.

Deste modo, o pequeno número de indivíduos positivos para SXF em nossa amostra pode ser explicado pelo critério de inclusão no estudo, que tornava elegível todo indivíduo com RM de causa desconhecida. Sabemos que, embora sintomas clínicos singulares não sejam específicos da síndrome, a combinação de sintomas físicos e comportamentais aumenta a possibilidade do indivíduo possuir a doença (Wattendorf et al., 2005). Vários parâmetros baseados em características físicas e de comportamento têm sido reunidos em checklists e utilizados pelos clínicos na pré-seleção dos indivíduos com RM, elegíveis para o teste molecular da SXF (De Vries et al., 1999; Bailey et al., 2008). Estudos que utilizam checklists na triagem clínica dos casos de RM alcançam índices maiores de positividade para a SXF. Em nosso estudo, embora tenhamos aplicado um checklist como ferramenta de triagem

para SXF, decidimos incluir todos os indivíduos analisados nas intuições participantes.

As características clínicas encontradas com mais frequência em nossa amostra foram o déficit de atenção 149 (62,6%) e características como hiperatividade, fronte proeminente, convulsões, comportamento autista e pés planos, representando 89 (37,4%), 80 (33,6%), 76 (31,9%), 71 (29,8%) e 69 (29%), respectivamente. Embora todas estas características sejam comumente observadas em indivíduos com SXF (Hagerman e Hagerman, 2002), a desordem de déficit de atenção com hiperatividade (ADHD) é uma característica bem freqüente, encontrada na maioria dos meninos e em 30% das meninas portadoras da síndrome (Hagerman et al., 2009).

Os familiares dos portadores de RM participantes dessa pesquisa desconheciam ser a síndrome do X frágil a mais importante causa genética de deficiência mental e, nem mesmo tinham conhecimento da existência de testes moleculares para o diagnóstico da doença. Entre profissionais de saúde, também, a SXF é uma condição ainda desconhecida. O esclarecimento sobre a doença foi oferecido às famílias dos dois indivíduos encontrados com mutação FRAXA em nosso trabalho, o que contribuiu sobremaneira para o entendimento da condição, do prognóstico, dos riscos de recorrência e dos testes diagnósticos disponíveis. Investigações futuras serão conduzidas nos membros destas famílias, de modo a verificarmos a segregação da doença. Ressaltamos, ainda, a importância da identificação de indivíduos com pré-mutações nas famílias, associadas com a síndrome do tremor/ataxia associado ao X frágil (FXTAS) após os 50 anos e a falha ovariana prematura (POF) (Jacquemont et al., 2004; Hagerman, 2010).

Contudo, a realidade do Estado do Maranhão ainda é deficiente em relação a serviços específicos necessários como modelo de suporte. Desta forma, este trabalho mostra-se de extrema importância ao propor um protocolo de triagem molecular eficiente para famílias de indivíduos com RM.

## 7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A prevalência da SXF entre indivíduos do sexo masculino com RM inseridos em instituições de educação especial e hospitais psiquiátricos de São Luís do Maranhão foi de 0,84%;
2. Duas mutações diferentes no gene *FMR1* foram encontradas em dois indivíduos, ambos com história familiar de RM: a expansão de repetições CGG no exon 1 e a deleção de aproximadamente 197 pb na região das repetições CGG;
3. A maioria dos indivíduos triados para SXF tinha déficit de atenção (62,6%) e características como hiperatividade, fronte proeminente, convulsões, comportamento autista e pés planos;
4. Ambos os probandos com mutações em *FMR1* tinham mais de 18 anos e possuíam história familiar de RM ligado ao X, o que evidencia o diagnóstico tardio da condição entre portadores de RM e a segregação da mutação nessas famílias, reforçando a necessidade da implementação de programas eficientes para o diagnóstico precoce da SXF no Estado do Maranhão.

## REFERÊNCIAS

Abe-Sandes K, Silva WA Jr, Zago MA. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. *Hum Biol.* 2004 Feb;76(1):77-86.

Adinolfi S, Bagni C, Musco G, Gibson T, Mazzarella L, Pastore A. Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. *RNA.* 1999 Sep;5(9):1248-58.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* 4th edn Washington DC; 1994.

Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL et al. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet.* 1993 Jul; 4(3):244-51.

Aspillaga M, Jara L, Avendaño I, López M. Fragile X syndrome. Clinical analysis of 300 Chilean patients with unspecific mental retardation. *Rev Med Chil.* 1998 Dec;126(12):1447-54.

Assis SG. Children and youth with and without disabilities. *Cien Saude Colet.* 2009 Jan-Feb;14(1): 26-9.

Assunção Junior FP. Retardo mental. In: Miguel EC, editor. *Clinica psiquiátrica.* Barueri (SP): Manole; 2011. p. 1065- 84.

Barbosa AAL, Sousa SMB, Abé- Sandes K, Alonso CA, Schneider V, Costa DCC et al. Microsatellite studies on an isolated population of African descent in the Brazilian state of Bahia. *Genet. Mol. Biol.* 2006; 29(1):23-30.

Bardoni B, Mandel JL, Fisch GS. FMR1 gene and fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000 Summer; 97(2):153-63.

Bastaki LA, Hegazy F, Al-Heneidi MM, Turki N, Azab AS, Naguib KK. Fragile X syndrome: a clinico-genetic study of mentally retarded patients in Kuwait. *East Mediterr Health J.* 2004 Jan-Mar;10(1-2):116-24.



Baker KB, Wray SP, Ritter R, Mason S, Lanthorn TH, Savelieva KV. Male and female Fmr1 knockout mice on C57 albino background exhibit spatial learning and memory impairments. *Genes Brain Behav.* 2010 Aug;9(6):562-74.

Berger R, Bloomfield CD, Sutherland GR. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. *Cytogenet Cell Genet.* 1985; 40(1-4): 490-535.

Behery AK. Fragile x-syndrome: clinical and molecular studies. *J Egypt Public Health Assoc.* 2008;83(3-4):273-83.

Bailey DB Jr, Skinner D, Davis AM, Whitmarsh I, Powell C. Ethical, legal, and social concerns about expanded newborn screening: fragile X syndrome as a prototype for emerging issues. *Pediatrics.* 2008 Mar;121(3):693-704.

Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron.* 2008 Oct 23;60(2):201-14

Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 2004 Jul;27(7):370-7.

Brown V, Small K, Lakkis L, Feng Y, Gunter C, Wilkinson KD. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19; 273(25): 15521-7.

Brown WT. The FRAXE Syndrome: is it time for routine screening? *Am J Hum Genet.* 1996 May;58(5):903-5.

Chung MY, Ranum LP, Duvick LA, Servadio A, Zoghbi HY, Orr HT. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet.* 1993 Nov; 5(3):254-8.

Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R et al. Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet A.* 2008 Apr 15; 146A(8): 1009-16.

Coffee B, Ikeda M, Budimirovic DB, Hjelm LN, Kaufmann WE, Warren ST. Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2008 May 15;146A(10):1358-67.

Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, Warren ST. Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet.* 2009 Oct; 85(4):503-14.

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10): 5401-4.

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. The fragile X mental retardation protein is associated with poly (A) + mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet.* 1997 Sep; 6(9): 1465-72.

Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genet Med.* 2001 Sep-Oct;3(5): 359-71.

Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, et al. Sherman. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet.* 2002 Jul 1; 110(3): 226-33.

Cummings CJ, Zoghbi HY. Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:281-328.

Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet.* 1997 Nov 12;72(4):468-77.

Dawson AJ, Chodirker BN, Chudley AE. Frequency of FMR1 premutations in a consecutive newborn population by PCR screening of Guthrie blood spots. *Biochem Mol Med.* 1995 Oct; 56(1): 63-9.

De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 1993 Jan; 3(1): 31-5.

De Vries BB, Van den Ouweland AM, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Mol E, Gelsema K, et al. Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: an epidemiological and psychological survey. Collaborative Fragile X Study Group. *Am J Hum Genet.* 1997 Sep; 61(3): 660-7.

De Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Halley DJ, Niermeijer MF, Oostra BA, Willemsen R. Screening with the FMR1 protein test among mentally retarded males. *Hum Genet.* 1998 Oct;103(4):520-2.

De Vries BB, Mohkamsing S, van den Ouweland AM, Mol E, Gelsema K, van Rijn M et al. Screening for the fragile X syndrome among the mentally retarded: a clinical study. The Collaborative Fragile X Study Group. *J Med Genet.* 1999 Jun;36(6):467-70.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X permutation. *Nat Genet.* 1993 Aug; 4(4): 335-40.

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 1993 Aug;2(8):1147-53. Errata em: *Hum Mol Genet.* 1994a Apr; 3(4): 684-5.

Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet.* 1994b Sep; 8(1): 88-94.

Eichler EE, Macpherson JN, Murray A, Jacobs PA, Chakravarti A, Nelson DL. Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 1996 Mar; 5(3): 319-30.

Fan H, Booker JK, McCandless SE, Shashi V, Fleming A, Farber RA. Mosaicism for an FMR1 gene deletion in a fragile X female. *Am J Med Genet A.* 2005 Jul 15;136(2):214-7.

Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell.* 1997 Dec;1(1):109-18.

Finucane B, Abrams L, Cronister A, Archibald AD, Bennett RL, McConkie-Rosell A. Genetic counseling and testing for FMR1 gene mutations: practice guidelines of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns.* 2012 Dec;21(6):752-60

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991 Dec 20;67(6):1047-58.

Garcia Arocena D, de Diego Y, Oostra BA, Willemsen R, Mirta Rodriguez M. A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet.* 2000 Mar;106(3):366-9.

Gasteiger M, Grasbon-Frodl E, Neitzel B, Kooy F, Holinski-Feder E. FMR1 gene deletion/reversion: a pitfall of fragile X carrier testing. *Genet Test.* 2003 Winter; 7(4):303-8.

González-del Angel A, Vidal S, Saldaña Y, del Castillo V, Angel Alcántara M, Macías M, et al. Molecular diagnosis of the fragile X and FRAXE syndromes in patients with mental retardation of unknown cause in Mexico. *Ann Genet.* 2000 Jan-Mar;43(1):29-34.

Gothelf D, Furfaro JA, Penniman LC, Glover GH, Reiss AL. The contribution of novel brain imaging techniques to understanding the neurobiology of mental retardation and developmental disabilities. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2005; 11(4):331-9.

Gronskov K, Hjalgrim H, Bjerager MO, Brondum-Nielsen K. Deletion of all CGG repeats plus flanking sequences in FMR1 does not abolish gene expression. *Am J Hum Genet.* 1997 Oct;61(4):961-7.

Grossman AW, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. Local Protein Synthesis and Spine Morphogenesis: Fragile X Syndrome and Beyond. *J Neurosci.* 2006;26:7151-5

Haddad LA, Aguiar MJ, Costa SS, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD. Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys. *Am J Med Genet.* 1999 May 28;84(3):198-201.

Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD. A PCR based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet.* 1996 Jun; 97(6):808-12.

Hagerman R, Hoem G, Hagerman P. Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Mol Autism.* 2010 Sep 21;1(1):12.

Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A et al. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics.* 2009; 123 (1): 378 - 90.

Hagerman RJ. The fragile X prevalence paradox. *J Med Genet.* 2008 Aug; 45(8): 498-9. Errata em: *J Med Genet.* 2008 Nov; 45(11): 768.

Hagerman RJ. The physical and behavioral phenotype: In: Hagerman RJ, Hagerman PJ, editors. *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*. 3rd ed. Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press; 2002:136–68.

Hagerman RJ, Hills J, Scharfenaker S, Lewis H. Fragile X syndrome and selective mutism. *Am J Med Genet*. 1999 Apr 2;83(4):313-7.

Hagerman RJ. The physical and behavioral phenotype. In: Hagerman RJ, Cronister A, editors. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press; 1996.p.03-109.

Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, Carpenter I, Staley LW, O'Connor RA et al. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am J Med Genet*. 1994 Jul 15;51(4):298-308.

Hallahan BP, Daly EM, Simmons A, Moore CJ, Murphy KC, Murphy DD. Fragile X syndrome: a pilot proton magnetic resonance spectroscopy study in premutation carriers. *J Neurodev Disord*. 2012 Aug 30; 4(1):23.

Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G. Fragile X syndrome and deletions in FMR1: new case and review of the literature. *Am J Med Genet*. 1997 Nov 12; 72(4):430-4.

Han XD, Powell BR, Phalin JL, Chehab FF. Mosaicism for a full mutation, premutation, and deletion of the CGG repeats results in 22% FMRP and elevated FMR1 mRNA levels in a high-functioning fragile X male. *Am J Med Genet A*. 2006 Jul 1;140(13):1463-71.

Hawk JD, Stefanovic L, Boyer JC, Petes TD, Farber RA. Variation in efficiency of DNA mismatch repair at different sites in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Jun 14; 102(24): 8639-43.

Hecimovic S, Tarnik I, Barisic I, Cakarun Z, Pavelic, K. Screening for fragile X syndrome: Results from a school of mentally retarded children. *Acta Paediatr*. 2002; 91: 535–539.

Hessl D, Nguyen DV, Green C, Chavez A, Tassone F, Hagerman RJ, et al. A solution to limitations of cognitive testing in children with intellectual disabilities: the case of fragile X syndrome. *J Neurodev Disord*. 2009 Mar;1(1):33-45.

Heyer E, Puymirat J, Dieltjes P, Bakker E, De Knijff P. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum Mol Genet.* 1997 May;6(5):799-803

Hill MK, Archibald AD, Cohen J, Metcalfe SA. A systematic review of population screening for fragile X syndrome. *Genet Med.* 2010 Jul;12(7):396-410.

Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE et al. Tissue specific expression of FMR1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet.* 1993 Jan;3(1):36-43.

Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1991 Dec 1;41(3):289-94.

Hirst MC, Barnicoat A, Flynn G, Wang Q, Daker M, Buckle VJ, et al. The identification of a third fragile site, FRAXF in Xq27-28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum Mol Genet.* 1993 Feb; 2(2): 197-200.

Hoogeveen AT, Oostra BA. The fragile X syndrome. *J Inherit Metab Dis.* 1997 Jun; 20(2):139-51.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico. Brasil: IBGE; 2007.

Jacobs PA, Bullman H, Macpherson J, Youngs S, Rooney V, Watson A et al. Population studies of the fragile X: a molecular approach. *J Med Genet.* 1993 Jun; 30(6): 454-9.

Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA, Hall DA, Levine RA, Brunberg JA, et al. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA.* 2004 Jan 28;291(4):460-9.

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

Katz G, Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Publica Mex.* 2008;50 Suppl 2: S132-41.

- Kaufmann WE, Abrams MT, Chen W, Reiss AL. Genotype, molecular phenotype, and cognitive phenotype: correlations in fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1999 Apr 2;83(4):286-95.
- Kaufmann WE, Cortell R, Kau AS, Bukelis I, Tierney E, Gray RM et al. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. *Am J Med Genet A.* 2004 Sep 1;129A(3):225-34.
- Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet.* 2001 Jul 1; 10(14):1449-54.
- Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Côté F, Devys D et al. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet.* 1995 May;4(5):783-9.
- Kooy RF, Willemsen R, Oostra BA. Fragile X syndrome at the turn of the century. *Mol Med Today.* 2000 May;6(5):193-8.
- Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* 1994 Jun 17; 77(6):853-61.
- Knight SJ, Ritchie RJ, Chakrabarti L, Cross G, Taylor GR, Mueller RF, Hurst J, Paterson J, Yates JR, Dow DJ, Davies KE. A study of FRAXE in mentally retarded individuals referred for fragile X syndrome (FRAXA) testing in the United Kingdom. *Am J Hum Genet.* 1996 May;58(5):906-13.
- Kwon SH, Lee KS, Hyun MC, Song KE, Kim JK. Molecular screening for fragile x syndrome in mentally handicapped children in Korea. *J Korean Med Sci* 2001; 16: 271-5.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 15;10(4):329-38.
- Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jun 1;29(11):2276-83.

Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'donnell WT, Li W et al. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Oct 19;101(42):15201-6.

Lubs HA. A marker X-chromosome. *Am J Hum Genet*. 1969 May;21(3):231-44.

McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A, Abrams L, Bennett RL, Pettersen BJ. Genetic counseling for fragile x syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns*. 2005 Aug;14(4):249-70.

Martin JP, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry*. 1943 Jul; 6(3-4):154-7.

Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW. Trapping of messenger RNA by Fragile X mental retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet*. 2002 Nov 15; 11(24): 3007-17.

Mazzocco MM, Thompson L, Sudhalter V, Belser RC, Lesniak-Karpiak K, Ross JL. Language use in females with fragile X or Turner syndrome during brief initial social interactions. *J Dev Behav Pediatr*. 2006 Aug;27(4):319-28.

Merenstein SA, Sobesky WE, Taylor AK, Riddle JE, Tran HX, Hagerman RJ. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet*. 1996 Aug 9;64(2):388-94.

Mineur YS, Huynh LX, Crusio WE. Social behavior deficits in the Fmr1 mutant mouse. *Behav Brain Res*. 2006 Mar 15;168(1):172-5.

Milà M, Sánchez A, Badenas C, Brun C, Jiménez D, Villa MP et al. Screening for FMR1 and FMR2 mutations in 222 individuals from Spanish special schools: identification of a case of FRAXE-associated mental retardation. *Hum Genet*. 1997 Oct;100(5-6):503-7.

Mingroni-Netto RC, Angeli CB, Auricchio MT, Leal-Mesquita ER, Ribeiro-dos-Santos AK, Ferrari I et al. Distribution of CGG repeats and FRAXAC1/DXS548 alleles in South American populations. *Am J Med Genet*. 2002 Aug 15;111(3):243-52.

Mulatinho MV, Llerena JC, Pimentel MM. FRAXA screening in Brazilian institutionalized individuals with nonspecific severe mental retardation. *Genet Test*. 2000;4 (3):283-7.



Murray A, Macpherson JN, Pound MC, Sharrock A, Youings SA, Dennis NR, et al. The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission. *Hum Mol Genet.* 1997 Feb; 6(2):173-84.

Murray A, Youings S, Dennis N, Latsky L, Linehan P, McKechnie N. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet.* 1996 Jun; 5(6):727-35.

Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, et al. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell.* 1996 Apr 19;85(2): 237-45.

Muddashetty RS, Kelic S, Gross C, Xu M, Bassell GJ. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2007 May 16;27(20):5338-48.

National Institutes of Health. (2008). National Institutes of Health Research Plan on Fragile X Syndrome And Associated Disorders. Acesso em Abril, 2013. [http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/Documents/nih\\_fragilex\\_research\\_plan\\_2009.pdf](http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/Documents/nih_fragilex_research_plan_2009.pdf)

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 1991 May 24;252(5010):1097-102.

Oostra BA. Fragile X syndrome in humans and mice. *Acta Genet Med Gemellol.* 1996; 4(1-2):93-108.

Organização Mundial da Saúde. Retardamento mental: enfrentando o desafio. Washington DC;1986. Publicacion NPNSP/86/58. p. 1-14.

Patsalis PC, Sismani C, Hettinger JA, Boumba I, Georgiou I, Stylianidou G et al. Molecular screening of fragile X (FRAXA) and FRAXE mental retardation syndromes in the Hellenic population of Greece and Cyprus: incidence, genetic variation, and stability. *Am J Med Genet.* 1999 May 28;84(3):184-90.

Pandey UB, Phadke S, Mittal B. Molecular screening of FRAXA and FRAXE in Indian patients with unexplained mental retardation. *Genet Test.* 2002 Winter;6(4):335-9.

Pembrey ME, Barnicoat AJ, Carmichael B, Bobrow M, Turner G. An assessment of screening strategies for fragile S syndrome in the UK. *Health Technol Assess.* 2001; 5(7):1-95.

Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007; 8: 109-29.

Peprah E. Fragile X Syndrome: The FMR1 CGG Repeat Distribution Among World Populations. *Ann Hum Genet.* 2012 Mar;76(2):178-91.

Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT. Detection of full fragile X mutation. *Lancet.* 1992; 339: 271-2.

Petek E, Kroisel PM, Schuster M, Zierler H, Wagner K. Mosaicism in a fragile X male including a de novo deletion in the FMR1 gene. *Am J Med Genet.* 1999 May 28; 84(3):229-32.

Quan F, Grompe M, Jakobs P, Popovich BW. Spontaneous deletion in the FMR1 gene in a patient with fragile X syndrome and cherubism. *Hum Mol Genet.* 1995 Sep;4(9):1681-4.

Richards RI, Sutherland GR, 1994. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet.* 1994 Feb;6(2):114-6.

Riddle JE, Cheema A, Sobesky WE, Gardner SC, Taylor AK, Pennington BF et al. Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. *Am J Ment Retard.* 1998 May;102(6):590-601.

Roberts JE, Bailey DB Jr, Mankowski J, Ford A, Sideris J, Weisenfeld LA et al. Mood and anxiety disorders in females with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009 Jan 5; 150B(1):130-9.

Robinson H, Wake S, Wright F, Laing S, Turner G. Informed choice in fragile X syndrome and its effects on prevalence. *Am J Med Genet.* 1996 Jul 12;64(1):198-202.

Ropers HH, Hamel BC .X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2005 Jan;6(1):46-57.

Ropers HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Jun;16(3):260-9. Epub 2006 May 2.

Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med.* 1991 Dec 12; 325(24):1673-81.

Rousseau F. The fragile X syndrome: implications of molecular genetics for the clinical syndrome. *Eur J Clin Invest.* 1994 Jan; 24(1):1-10.

Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet.* 1995 Nov; 57(5):1006-18.

Rousseau F, Labelle Y, Bussi eres J, Lindsay C. The fragile x mental retardation syndrome 20 years after the FMR1 gene discovery: an expanding universe of knowledge. *Clin Biochem Rev.* 2011 Aug;32(3):135-62.

Santos CB. Síndrome do x frágil e retardo mental FRAXE: distribui o dos alelos FRAXA e FRAXE em indivíduos portadores de retardo mental idiopático no Estado do Rio de Janeiro.[Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Instituto de Biologia Roberto alc ntara gomes, P s gradua o em Biologia -Biociências Nucleares.

Santos FR, Pena SD, Epplen JT. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet.* 1993 Feb;90(6):655-6.

Schapiro MB, Murphy DG, Hagerman RJ, Azari NP, Alexander GE, Miezieski CM, et al. Adult fragile X syndrome: neuropsychology, brain anatomy, and metabolism. *Am J Med Genet.* 1995 Dec 18; 60(6):480-93.

Schmucker B, Ballhausen WG, Pfeiffer RA. Mosaicism of a microdeletion of 486 bp involving the CGG repeat of the FMR1 gene due to misalignment of GTT tandem repeats at chi-like elements flanking both breakpoints and a full mutation. *Hum Genet.* 1996 Oct;98(4):409-14.

Sherman SL. Epidemiology. In: Hagerman RJ, Hagerman PJ, editors. *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research.* 3rd ed. Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press; 2002:136–68.

Sherman SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000 Fall;97(3):189-94.

Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.* 1985; 69(4): 289-99.

Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet.* 1984 Jan;48(Pt 1):21-37.

Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G. FXR1, and autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J.* 1995 Jun 1; 14(11):2401-8.

Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell.* 1994 Apr 8; 77(1): 33-9.

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 1993 Jul 30; 74(2): 291-8.

Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ. *X-linked mental retardation.* New York: Oxford University Press; 2000.

Sotelo J. The challenge of mental disability. *Salud Publica Mex.* 2008; 50 Suppl 2: S121.

Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics*, 3th edition: Garland Science; 2005. p. 279-82.

Stein Z, Durkin M, Belmon L. 'Serious' mental retardation in developing countries: an epidemiologic approach. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;477:8-21.

Stefani G, Fraser CE, Darnell JC, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci.* 2004 Aug 18; 24(33): 7272-6.

Sullivan K, Hatton D, Hammer J, Sideris J, Hooper S, Ornstein P et al. ADHD symptoms in children with FXS. *Am J Med Genet A*. 2006 Nov 1;140(21):2275-88.

Sutherland GR, Mulley JC, Richards RI. Fragile X syndrome. The most common cause of familial intellectual handicap. *Med J Aust*. 1993 Apr 5;158(7):482-5.

Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*. 1977 Jul 15; 197(4300): 265-6.

Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA. FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet*. 1996 Jun; 5(6):809-13.

Tassone F, Hagerman RJ, Chamberlain WD, Hagerman PJ. Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 2000 Fall; 97(3): 195-203.

Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G. Fragile X syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005 Aug 15;137C(1):32-7.

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1996 Jul 12; 64(1): 196-7.

Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, et al. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*. 1993 Jun 24; 363(6431):722-4.

Verheij C, De Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N et al. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet*. 1995 May; 4(5):895-90.

Verkerk AJ, De Graff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E et al. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet*. 1993; 2:399-404.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991; 65(5): 905-14.

Warren ST, Sherman SL. The fragile X syndrome. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D. (eds) 2000. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, p. 3421.

Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. JAMA. 1994 Feb 16; 271(7): 536-42.

Wattendorf DJ, Muenke M. Diagnosis and management of Fragile X syndrome. Am Fam Physician. 2005; 72(1):111-3.

Webb TP, Bunday SE, Thake AI, Todd J. Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome. Am J Med Genet. 1986 Jan-Feb;23(1-2):573-80.

Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet. 1993 Aug; 2(8): 1123-8.

Wells RD. Mutation spectra in fragile X syndrome induced by deletions of CGG\*CCG repeats. J Biol Chem. 2009 Mar 20; 284(12):7407-11.

Willemsen R, Anar B, De Diego Otero Y, de Vries BB, Hilhorst-Hofstee Y, Smits A, et al. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis. Am J Hum Genet. 1999 Jul; 65(1): 98-103.

Willemsen R, Smits A, Severijnen LA, Jansen M, Jacobs A, De Bruyn E, et al. Predictive testing for cognitive functioning in female carriers of the fragile X syndrome using hair root analysis. J Med Genet. 2003 May; 40(5): 377-9.

Winnepenninckx B, Rooms L, Kooy FR. Mental retardation: a review of the genetic causes The British Journal of Developmental Disabilities. 2003 Jan; 49(96):29-44.

Wolff DJ, Gustashaw KM, Zurcher V, Ko L, White W, Weiss L, et al. Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern. Hum Genet. 1997 Aug;100(2):256-61.

World Health Organization. International classification of impairments, disabilities and handicaps. World Health Organization.Geneva; 1980.

World Health Organization. (2004). Mental retardation. Figures and Facts : From knowledge to action. Acesso em Janeiro, 2012.  
[http://www.searo.who.int/en/Section1174/Section1199/Section1567/Section1825\\_8093.htm](http://www.searo.who.int/en/Section1174/Section1199/Section1567/Section1825_8093.htm)).

Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*. 1991 May 24; 252(5009): 1179-81.

Yim SY, Jeon BH, Yang JA, Kim HJ. Fragile X syndrome in Korea: a case series and a review of the literature. *J Korean Med Sci*. 2008 Jun;23(3):470-6.

Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S et al. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):317-27.

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL et al. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J*. 1995 Nov 1; 14(21): 5358-66.

## ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

	 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b> <b>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO</b> <b>DIRETORIA ADJUNTA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO</b> <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL</b>	<b>Nº. do Parecer: 348/10</b> <b>Registro do CEP: 196/10</b> <b>Nº do Protocolo: 005368/2010-40</b> <b>Data de Entrada no CEP: 05/11/2010</b> <b>Parecer: APROVADO</b>	
<b>PROJETO DE PESQUISA</b>		
<b>I - Identificação:</b>		
Título do projeto: Análise clínica e molecular em indivíduos com deficiência mental idiopática no Maranhão: diagnóstico diferencial da SÍNDROME DO X FRÁGIL		
Identificação do Pesquisador Responsável: Arlene Mendes Caldas		
Identificação da Equipe executora: Márcia Pimentel, Arlene Mendes Caldas, Maria Teresa Martins Viveiros		
Instituição onde será realizado: Centro de Ensino de educação Especial Helena Antipoff; Clínica Lavardiére LTDA, Centro de ensino de Educação especial Padre João Mohana; Associação de Paes e Amigos dos Excepcionais/ Escola Eney Santana		
Área temática:	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 05.11.10
Cooperação estrangeira: Não		Data de devolução: 11.11.10

**II - Objetivos:**

- Investigar o gene *FMR1* em pacientes com retardo mental de causa desconhecida no Estado do Maranhão;
- Caracterizar os pacientes quanto ao sexo, idade e procedência;
- Identificar os sinais e sintomas de retardo mental.

**III- Sumário do projeto:**

Trata-se de pesquisa para fins de doutorado. Estudo a ser realizado com uma amostra de conveniência de 200 indivíduos não aparentados, do sexo masculino, portadores de RM ou deficiência de aprendizado triados. A coleta de dados será por meio de questionário contemplando questões relativas à história familiar de RM. Para o exame genético será extraído a partir de 5 mL de sangue periférico, colhido à vácuo em tubos contendo anti-coagulante EDTA. O projeto refere ser financiado pelo CNPq. Para a realização dos exames conta com a parceria da UERJ. A coleta está definida para o mês de novembro.

**IV - Comentários do relator frente à resolução 196/96 e complementares:**

O protocolo de pesquisa possui a seguinte estrutura: Folha de Rosto, Folhas de identificação, Sumário, Introdução, Fundamentação Teórica, Objetivos, Justificativas, Metodologia, Orçamento, Cronograma, Referência Bibliográficas, Currículo Lattes. Portanto, em conformidade com o estabelecido na Res. 196/96 CNS/MS.




**V - Parecer Consubstanciado do CEP**

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde / MS.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a este CEP, relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 06 de dezembro de 2010

  
Prof. Dr. João Inácio Lima de Souza  
Coordenador do CEP-HUUFMA  
Ethica homini habitat est

## ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
 Universidade Federal do Maranhão  
 Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – FISCLINEX  
 Curso de Doutorado Interinstitucional (DINTER – UFMA/UERJ)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Análise Clínica e Molecular em Indivíduos com Deficiência Mental Idiopática no Maranhão: Diagnóstico Diferencial da Síndrome do X Frágil  
 Instituição: Universidade Federal do Maranhão e Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Pesquisadores: Márcia Mattos Gonçalves Pimentel; Arlene Caldas; Maria Teresa Martins Viveiros; Jussara Mendonça dos Santos

REGISTRO: \_\_\_\_\_ PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa "Análise Clínica e Molecular em Indivíduos com Deficiência Mental Idiopática no Maranhão: Diagnóstico Diferencial da Síndrome do X Frágil", realizado pela Universidade Federal do Maranhão em colaboração com o Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A pesquisa tem como objetivo realizar um estudo com o gene *FMR1* em pacientes com retardo mental de causa desconhecida no Estado do Maranhão.

Este estudo genético terá uma duração de dois anos. A sua participação é voluntária e, a qualquer momento, poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, sem que haja penalização ou prejuízo ao cuidado do participante.

Será preenchido um questionário com a identificação e procedência do participante da pesquisa, e também realizado exame físico. Os exames para pesquisar os defeitos no gene *FMR1* serão gratuitos e realizados a partir de uma única amostra de 5ml de sangue coletada com material descartável. Embora esta coleta não apresente riscos ao participante, eventualmente, poderão ocorrer desconfortos e/ou manchas no local.

Asseguramos, entretanto, que todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe tecnicamente treinada para garantir que estas eventualidades sejam mínimas ou não ocorram. O material (DNA) extraído do sangue será armazenado no Serviço de Genética Humana da UERJ sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao participante ou responsável o direito de retirá-lo, a qualquer momento, se assim o desejar. Cada amostra de sangue será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

As condições de sigilo quanto às informações coletadas e aos resultados das análises, assim como, a identidade dos pacientes serão preservadas. Os resultados dos testes realizados somente serão revelados ao participante/responsável que autorizou a realização dos exames e também serão utilizados com fins científicos, podendo vir a ser divulgados em revistas científicas, respeitando a privacidade e o anonimato dos participantes.

Ao participante será fornecido todo e qualquer esclarecimento que se fizer necessário antes, durante e após a realização da pesquisa, que visa beneficiar os participantes através dos diagnósticos encontrados.

Autorizo, por este documento, a Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas e sua equipe a incluir meu filho (a) neste projeto. Posso discutir as questões relacionadas aos meus direitos e os problemas relacionados com minha participação neste projeto, durante ou depois de sua realização, com Prof<sup>a</sup> Dra. Arlene de Jesus Mendes Caldas e/ou sua equipe, pelo telefone (098) 3232-3312, Departamento de Enfermagem situado à Rua Viana Vaz, nº 220, Centro, São Luís-MA, ou com o Coordenador do Comitê de Ética da Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Hospital Universitário- Unidade Presidente Dutra, à Rua Barão de Itapary, nº227 Centro, telefone-3219-1223. Este documento será assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador.

\_\_\_\_\_  
 Nome do participante

\_\_\_\_\_  
 Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do responsável legal (em caso de menores de 18 anos)

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO C – Ficha clínica

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
**Universidade Federal do Maranhão**  
**Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental –**  
**FISCLINEX**  
**Curso de Doutorado interinstitucional (DINTER – UFMA/UERJ)**

NOME:	Registro:	N°:	
DN:	Idade:	Origem:	

# Heredograma

## # Anormalidades Neurológicas

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Convulsões                      | <input type="checkbox"/> Per. cefálico aumentado |
| <input type="checkbox"/> Déficit de atenção              | <input type="checkbox"/> Face alongada           |
| <input type="checkbox"/> Hiperatividade                  | <input type="checkbox"/> Orelhas grandes         |
| <input type="checkbox"/> Contato pobre com os olhos      | <input type="checkbox"/> Fronte proeminente      |
| <input type="checkbox"/> Defensivo ao tato               | <input type="checkbox"/> Mandíbula proeminente   |
| <input type="checkbox"/> Movimento estereotipado de mãos | <input type="checkbox"/> Pectus excavatum        |
| <input type="checkbox"/> Temperamento dócil              | <input type="checkbox"/> Flacidez ligamentar     |
| <input type="checkbox"/> Fala rápida/repetitiva          | <input type="checkbox"/> Pés planos              |
| <input type="checkbox"/> Comportamento autista           | <input type="checkbox"/> Prega simiesca / Sydney |
| <input type="checkbox"/> Morde as mãos                   | <input type="checkbox"/> Macroorquidismo         |
| <input type="checkbox"/> Retardo Mental _____            | Outros _____                                     |

## # Estudo Citogenético

Técnica: \_\_\_\_\_ N° de células: \_\_\_\_\_ % células: \_\_\_\_\_

## # Estudo molecular

Sonda: \_\_\_\_\_  
 Repetição CGG: \_\_\_\_\_ Metilação: \_\_\_\_\_