



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camilla Pereira da Silva

**Investigação de novos mecanismos genéticos e epigenéticos  
relacionados à Síndrome do X-frágil**

Rio de Janeiro  
2022

Camilla Pereira da Silva

**Investigação de novos mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados à  
síndrome do X-frágil**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de  
Pós-Graduação em Biociências, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Helena de Oliveira Reis

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Camilla Pereira da.  
Investigação de novos mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados à síndrome do X frágil / Camilla Pereira da Silva. - 2022.  
161 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cíntia Barros Santos Rebouças  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Helena de Oliveira Reis

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Genética humana – Teses. 2. Síndrome do Cromossomo do X Frágil. 3. Deficiência intelectual - Teses. 4. Patologia Molecular. I. Rebouças, Cíntia Barros Santos. II. Reis, Adriana Helena de Oliveira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 575.224.4

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Camilla Pereira da Silva

**Investigação de novos mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados à  
síndrome do X-frágil**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de  
Pós-Graduação em Biociências, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de abril de 2022.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Helena de Oliveira Reis

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayse Aparecida da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sheila Coelho Soares Lima  
Instituto Nacional do Câncer

---

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta  
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

Às crianças, por sua forma genuína de olhar o mundo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar e iluminar meu caminho.

À minha mãe pelo amor, dedicação e paciência em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. A você que me apoia e incentiva a seguir em frente, que me ensina a ser responsável e agir com honestidade e respeito. Devo a você o que sou hoje e todas as conquistas que eu venha a ter.

À prof.<sup>a</sup> Cintia Santos-Rebouças pela orientação, dedicação, confiança, disponibilidade e pelos importantes ensinamentos ao longo desses anos de formação.

À prof.<sup>a</sup> Adriana Reis pela coorientação e disposição em ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

À prof.<sup>a</sup> Sheila Coelho, do INCA, pelas importantes contribuições para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Diego Camuzi por toda a ajuda, ensinamentos e análises de bioinformática essenciais para este trabalho. À Monique Lopes pela ajuda com o pirosequenciamento.

Ao prof. Miguel Moreira, do INCA, pela colaboração com os sequenciamentos.

Ao prof. Enrique Medina-Acosta (UENF) e ao prof. Filipe Brum Machado (UEMG), por disponibilizarem os primers e protocolo para amplificação de marcadores no cromossomo X e pela ajuda com a análise.

À prof.<sup>a</sup> Márcia Pimentel pela orientação durante a minha iniciação científica e mestrado, pela confiança em abrir as portas do SERVGEN para mim e pelos conselhos ao longo da minha trajetória no grupo.

A toda a equipe do SERVGEN pelos muitos ensinamentos. À Andressa, Luma e Jussara pela paciência, pela disposição em ajudar e pelos importantes ensinamentos de coleta, bancada e respeito a cada um dos nossos pacientes. À Sharbilla, Beatriz e Gabriela, pela companhia, pelo agradável convívio, conversas e momentos de descontração. À Mateus e Maria Clara pelas conversas e pelos controles voluntários. Ao André pelas conversas, seja bem-vindo de volta. À Evelyn e Carol pelo apoio e ajuda, saudade do convívio diário com vocês. Um agradecimento especial ao André e à Andressa, que durante a pandemia, me ajudaram muito com apoio logístico e técnico essencial para que tudo funcionasse

conforme o planejado e que eu conseguisse concluir em meio às dificuldades do momento.

Ao meu bando, Larissa, Aline, Sidney, Carol, Vanusca, Alexia e Pedro pela amizade e apoio. Obrigada pela alegria nas bagunças e farinhas que me dão força pra seguir adiante e por estarem sempre presentes e transformarem todos os momentos juntos em momentos especiais, até mesmo virtualmente. À Gisele, minha psicóloga, pelo apoio ao longo de todo esse período, principalmente nos momentos mais tensos.

Aos pacientes e seus responsáveis que aceitaram participar dessa pesquisa para que se possa aprimorar o conhecimento sobre a deficiência intelectual e, mais especificamente, sobre a síndrome do X Frágil.

A todos os professores, em especial aos professores e funcionários do PPGB e da UERJ.

Às agências de fomento FAPERJ, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. À CAPES e CNPq, pela concessão de minhas bolsas.

A todos que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Faça o teu melhor na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores [...].

*Mário Sergio Cortella*



## RESUMO

SILVA, Camilla Pereira da. *Investigação de novos mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados à síndrome do X-frágil*. 2022. 161f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A síndrome do X Frágil (SXF) é determinada por uma expansão instável da repetição de trinucleotídeos CGG na região 5' UTR do gene *FMR1*, sendo reconhecidas quatro categorias alélicas: normal (N,  $\leq 44$  CGGs), intermediária (I, 45-54 CGGs), pré-mutação (PM, 55-200 CGGs) e mutação completa (FM,  $>200$  CGGs). Os indivíduos com a SXF apresentam a FM, que resulta no silenciamento do gene por hipermetilação das repetições CGG e do promotor do gene *FMR1*. A instabilidade nas repetições expandidas pode resultar em mosaicismos de tamanho, formado pela FM com outras categorias de alelos ou com deleções. Com a dificuldade de amplificar essa região, a investigação da SXF é complexa. Ainda, dados recentes apontaram para uma borda de metilação a montante das repetições, que é perdida em pacientes com a SXF, levando à disseminação de uma metilação *de novo* até o promotor do *FMR1*. Com isso, o presente estudo teve como objetivos principais reavaliar um grupo de 101 homens com SXF, visando a caracterização de padrões atípicos, analisar a presença da borda de metilação e identificar novos marcadores epigenéticos próximos às repetições. Através da metodologia de reação em cadeia da polimerase direcionada para repetições de trincas (TRP-PCR), a FM “pura” foi confirmada em 52,5% dos indivíduos. Já 27,7% dos pacientes apresentaram mosaicismos de tamanho, sendo 15,8% com PM+FM, 8,9% com N+FM e 3% com N+PM+FM. Seis pacientes (5,9%) ainda apresentavam uma deleção próxima às repetições, evidenciada por metodologias adicionais, podendo observar microhomologia entre os pontos de quebra em alguns deles. A análise de marcadores genéticos no cromossomo X não revelou nenhum caso de síndrome de Klinefelter (47,XXY) entre os casos atípicos de mosaicismos de tamanho. A literatura tem relatado casos de mosaicismos de tamanho com frequências de 12 a 41%. Através de pirosequenciamento de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio, foi possível observar uma redução nos níveis de metilação nas CpGs 65-70 à montante do *FMR1* em controles, ratificando a presença da borda de metilação, estando esta ausente em pacientes com FM, o que corrobora dados da literatura. Essa borda também parece ser perdida nos indivíduos com mosaicismos de tamanho. Como destaque deste estudo, identificamos uma CpG intrônica com um padrão de metilação inesperado no *heatmap*, estando hipermetilada em indivíduos controles e hipometilada em pacientes com a SXF. Estudos recentes sugerem que a metilação de elementos intragênicos estejam envolvidos na regulação da expressão gênica. Portanto, esta CpG tem grande potencial para ser usada como um novo marcador epigenético para a SXF, com um valor de corte de 69,5% e especificidade, sensibilidade e acurácia de 100%. Estes resultados promissores podem estimular o desenvolvimento de uma nova metodologia para o diagnóstico para a SXF.

Palavras-chave: Deficiência Intelectual. Cromossomo X. Síndrome do X-frágil. Perfis atípicos. Marcadores epigenéticos. Diagnóstico molecular.

## ABSTRACT

SILVA, Camilla Pereira da. *Investigation of novel genetic and epigenetic mechanisms related to fragile X syndrome*. 2022. 161f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Fragile X syndrome (SXF) is determined by an unstable expansion of CGG trinucleotides repetition in the 5'UTR region of the *FMR1* gene, with four recognized allele categories: normal (N,  $\leq 44$  CGGs), intermediate (I, 45-54 CGGs), premutation (PM, 55-200 CGGs) and full mutation (FM,  $> 200$  CGGs). SXF patients carry the FM allele, which results in gene silencing by hypermethylation of the CGG repeat and *FMR1* gene promoter. CGG expansions instability can result in size mosaicism, formed by FM along with other allele categories or deletions. Due to the difficulty in amplifying this sequence, the molecular investigation of SXF is complex. Besides that, a recent study has suggested a methylation boundary upstream of the CGG repeat, which is lost in SXF patients and leads to a *de novo* methylation spreading to the *FMR1* promoter. Thus, the present study aimed to reevaluate a group of 101 SXF males, to characterize atypical profiles, analyze the presence of the methylation boundary and identify novel epigenetic markers close to the CGG repeat. Using Triplet Repeat Primed Polymerase Chain Reaction (TRP-PCR), a “pure” FM profile was confirmed in 52.5% of the SXF patients. 27.7% of the patients had size mosaicism: 15.8% with PM+FM, 8.9% with N+FM and 3% with N+PM+FM. Six patients (5.9%) had a deletion close to the repetitions, evidenced by additional methodologies, and microhomology could be observed between the breakpoints in some of them. The analysis of genetic markers in X chromosome revealed no cases of Klinefelter syndrome (47,XXY) among the atypical cases. Size mosaicism cases have been reported in the literature with frequencies of 12 to 41%. Using pyrosequencing after genomic DNA treatment with sodium bisulfite, it was possible to observe a reduction in methylation levels in CpGs 65-70 upstream of *FMR1* in controls, ratifying the presence of the methylation boundary, absent in FM patients, which corroborates literature data. This boundary also seems to be lost in individuals with size mosaicism. As a highlight of this study, we identified an intronic CpG with an unexpected methylation pattern in the *heatmap*, being hypermethylated in controls and hypomethylated in FXS patients. Recent studies suggest that the methylation of intragenic elements is involved in the regulation of gene expression. Therefore, this CpG has great potential to be used as a new epigenetic marker for FXS, with a cut-off value of 69.5% and specificity, sensitivity and accuracy of 100%. These promising results may stimulate the development of a new diagnostic methodology for FXS.

Keywords: Intellectual Disability. X-chromosome. Fragile X syndrome. Atypical profiles. Epigenetic markers. Molecular Diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Genes no cromossomo X associados à DI.....	24
Figura 2 – Cariótipo parcial por bandeamento GTG, mostrando o cromossomo X de indivíduo sem a SXF em comparação com um indivíduo com o sítio frágil relacionado à SXF [fra(X)(q27.3)].....	25
Figura 3 – Localização cromossômica e estrutura do gene <i>FMR1</i> , seu principal transcrito e a proteína FMRP.....	28
Figura 4 – Quatro classes alélicas encontradas na região 5' UTR do gene <i>FMR1</i> e suas consequências funcionais.....	29
Figura 5 – Perfis de metilação na região promotora do gene <i>FMR1</i> e na região 5' UTR em linhagens celulares de homens com e sem SXF e em homens altamente funcionais.....	38
Figura 6 – Perfis de metilação na região promotora do gene <i>FMR1</i> e no segmento 5' à montante em linhagens celulares de mulheres saudáveis, homens e mulheres pré-mutados, mulheres com a mutação completa e pacientes com a síndrome de Turner (45,X).....	40
Figura 7 – Esquema das etapas realizadas na primeira parte deste estudo.....	45
Figura 8 – Esquema das etapas realizadas na segunda parte deste estudo.....	46
Figura 9 – Fluxo da metodologia de amplificação por PCR e análise de metilação na região de repetições CGG, utilizando o kit AmplideX® <i>FMR1</i> mPCR (Asuragen, Inc.).....	50
Figura 10 – Princípios da metodologia de TRP-PCR, utilizando o kit AmplideX® <i>FMR1</i> mPCR (Asuragen, Inc.).....	51
Figura 11 – Fluxograma de análise dos dados (tamanho de fragmentos e metilação) da região de repetições CGG no gene <i>FMR1</i> , através do programa GeneMarker v.2.6.3 (SoftGenetics).....	52
Figura 12 – Princípio da técnica de pirosequenciamento.....	68
Figura 13 – Cálculo de hipotenusa a partir de uma curva Roc.....	70

Figura 14 – Resultados da amplificação de amostras de DNA de pacientes, ilustrando os diferentes perfis encontrados.....	73
Figura 15 – Eletroferograma do sequenciamento referente ao paciente P928/04....	81
Figura 16 – Resultados da análise de marcador no gene <i>SHOX</i> , ilustrando a ausência de um segundo cromossomo X nas amostras de pacientes atípicos.....	84
Figura 17 – Representação de potenciais vias para geração de contrações e deleções.....	88
Figura 18 – Perfis de metilação na borda de metilação próxima à região promotora do gene <i>FMR1</i> em linhagens celulares de homens com e sem SXF antes e após o tratamento com o agente desmetilante 5-azadesoxicitidina (5-azadC).....	90
Figura 19 – Localização de elementos genéticos e epigenéticos no início do gene <i>FMR1</i> .....	93
Figura 20 – <i>Heatmap</i> com dados de metilação no gene <i>FMR1</i> gerado a partir de bancos de dados <i>online</i> .....	95
Figura 21 – Gráfico de linhas com os dados de metilação referentes às CpGs 65 a 71, avaliada por pirosequenciamento.....	100
Figura 22 – <i>Box plots</i> com os dados de metilação referentes às CpGs 65 a 71, avaliada por pirosequenciamento.....	101
Figura 23 – Distribuição e curva Roc com os dados de metilação para a sonda cg22417678, disponíveis na literatura.....	110
Figura 24 – <i>Box plot</i> com os dados de metilação referentes à primeira CpG analisada no intron 2 (sonda cg22417678).....	114
Figura 25 – Curva ROC com os dados de metilação referentes à primeira CpG analisada no intron 2 (sonda cg22417678), por pirosequenciamento....	115
Figura 26 – Resultados da amplificação com o kit AmplideX® <i>FMR1</i> mPCR de amostras de DNA da família P4210/14, ilustrando o padrão “onda” observado na faixa de mutação completa nos meninos.....	119
Figura 27 – Gráfico de linhas com os dados de metilação referentes às CpGs 65 a 71, avaliada por pirosequenciamento.....	122
Figura 28 – <i>Box plots</i> com os dados de metilação referentes às CpGs 65 a 71, avaliada por pirosequenciamento.....	129

Figura 29 – Curva ROC com os dados de metilação referentes à primeira CpG analisada no intron 2 (sonda cg22417678), por pirosequenciamento,	
Figura 30 – incluindo os casos P4210/14.....	127
Resultados da amplificação com o kit AmplideX® <i>FMR1</i> mPCR de amostras de DNA do probando P537/00, ilustrando o padrão onda observado na faixa de mutação completa.....	128

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Probabilidade de surgimento do alelo de mutação completa no gene <i>FMR1</i> na prole, de acordo com a extensão das repetições do alelo de pré-mutação materna.....	31
Quadro 2 – Contrações observadas no alelo transmitido por vias materna e paterna, de acordo com Nolin e colaboradores (2019).....	33
Quadro 3 – Condições de ciclagem utilizadas no sequenciamento.....	57
Quadro 4 – Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR das regiões de interesse para análise de marcadores.....	59
Quadro 5 – Condições utilizadas nos ensaios de PCR para amplificação dos fragmentos para análise de marcadores.....	59
Quadro 6 – Condições de ciclagem utilizadas nos ensaios de PCR para amplificação dos fragmentos para análise de metilação.....	59
Quadro 7 – Sondas de metilação no gene <i>FMR1</i> , utilizadas nos ensaios de <i>array</i> , cujos dados estavam disponíveis publicamente no GEO database.....	63
Quadro 8 – Condições utilizadas nos ensaios de PCR para amplificação dos fragmentos para análise de metilação.....	65
Quadro 9 – Condições de ciclagem utilizadas nos ensaios de PCR para amplificação dos fragmentos para análise de metilação.....	66
Quadro 10 – Matriz de confusão.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados gerais sobre a amostra de indivíduos estudada.....	71
Tabela 2 – Dados genotípicos sobre a amostra de indivíduos estudada, avaliados por TRP-PCR.....	72
Tabela 3 – Estimativa aproximada da extensão dos fragmentos observados neste trabalho, sugerindo a presença de deleção.....	80
Tabela 4 – Localização genômica e extensão das deleções identificadas neste estudo e por Gonçalves <i>et al.</i> , 2016.....	82
Tabela 5 – Valores de metilação nas CpGs referentes à borda de metilação na amostra de indivíduos estudada.....	97
Tabela 6 – Valores de metilação nas CpGs referentes à sonda cg22417678 e na CpG à jusante na amostra de indivíduos estudada.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-azadC	5-azadesoxicitidina
5' UTR	Região 5' não traduzida ( <i>5' Untranslated region</i> )
A	Adenina
APS	Adenosina 5'fosfosulfato
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Citosina
chrX	Cromossomo X
CNS/MS	Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde
CT	Controle
del	Deleção
DI	Deficiência intelectual
DILX	Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X
DILX-NS	Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X não síndrômica
DILX-S	Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X síndrômica
DI-NS	Deficiência intelectual não síndrômica
DI-S	Deficiência intelectual síndrômica
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FREE1	Elementos Epigenéticos Relacionados ao X-Frágil 1
FREE2	Elementos Epigenéticos Relacionados ao X-Frágil 2
FM	Alelo completamente mutado ( <i>Full mutation allele</i> )
<i>FMR1</i>	Gene <i>Fragile X Mental Retardation 1</i>
FMRP	Proteína <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FXPOI	Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X Frágil
FXTAS	Síndrome de Tremor e Ataxia Associada ao X Frágil
G	Guanina
gDNA	DNA genômico
HCl	Ácido clorídrico



HFMs	Homens altamente funcionais ( <i>High functioning males</i> )
HTT	Gene da huntingtina
HUGG/UNIRIO	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
HUPE/UERJ	Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
I	Alelo intermediário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICX	Inativação do cromossomo X
IEDE	Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia Luiz Capriglione
TF	Fator de transcrição ( <i>transcriptional factor</i> )
IFF/FIOCRUZ	Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz
INCa	Instituto Nacional de Câncer
IPPMG/UFRJ	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro
MAF	Frequência do alelo menos frequente ( <i>Minor Allele Frequency</i> )
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mPCR	PCR de metilação
N	Alelo normal
NLS	Domínio de sinal de localização nuclear ( <i>nuclear localization signal</i> )
NES	Domínio do sinal de exportação nuclear ( <i>nuclear export signal</i> )
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PM	Alelo de pré-mutação
PPi	Pirofosfato
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNA <sub>m</sub> / mRNA	RNA mensageiro
SERVGEN/UERJ	Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
SNV	Variante de nucleotídeo único ( <i>Single nucleotide variant</i> )

SXF	Síndrome do X Frágil
T	Timina
<i>Taq</i>	Enzima DNA polimerase extraída de <i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tris, HCl e EDTA
TRP-PCR	Reação em cadeia da polymerase direcionada para repetições de trincas ( <i>Triplet Repeat Primed Polymerase Chain Reaction</i> )
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UNIGRANRIO	Universidade do Grande Rio

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
∞	Infinito
+	Soma
-	Subtração
×	Multiplicação
X	Veze
V	Volts
®	Marca registrada
™	<i>trade mark</i>
KDa	KiloDalton
pb	Pares de bases
kb	Kilobase
°C	Graus Celsius
H <sub>2</sub> O	Molécula da água
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
ng	Nanograma
min	Minutos
seg	Segundos
U	Unidades

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
1.1	<b>Geral</b> .....	42
1.2	<b>Específicos</b> .....	42
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	43
2.1	<b>Pacientes com SXF</b> .....	43
2.2	<b>Coleta de material biológico</b> .....	47
2.3	<b>Extração de DNA</b> .....	47
2.4	<b>Estimativa de integridade e concentração do DNA</b> .....	48
2.5	<b>Amplificação e análise da metilação nas repetições CGG</b> .....	49
2.5.1	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> .....	49
2.6	<b>Análise de deleções próximas à região de repetições CGG</b> .....	54
2.6.1	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> .....	54
2.6.2	<u>Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento dos ensaios de PCR</u> .....	55
2.6.3	<u>Purificação dos produtos da PCR</u> .....	56
2.6.4	<u>Reação de sequenciamento de Sanger</u> .....	56
2.7	<b>Análise de marcadores nos cromossomos X e Y</b> .....	58
2.7.1	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> .....	58
2.7.2	<u>Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento dos ensaios de PCR</u> .....	60
2.7.3	<u>Eletroforese capilar</u> .....	60
2.8	<b>Análise por ferramentas computacionais e produção de <i>heatmaps</i></b> .....	61
2.9	<b>Análise de metilação da região da borda de metilação e de parte do intron 2</b> .....	64
2.9.1	<u>Conversão do DNA genômico com bissulfito de sódio</u> .....	64
2.9.2	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> .....	65
2.9.3	<u>Avaliação da qualidade dos fragmentos amplificados e do rendimento dos ensaios de PCR</u> .....	66
2.9.4	<u>Pirosequenciamento</u> .....	67

2.10	<b>Análise por Bioinformática e produção de curvas ROC.....</b>	69
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	71
3.1	<b>Casuística.....</b>	71
3.2	<b>Análise para caracterização de perfis mutacionais atípicos.....</b>	71
3.2.1	<u>Identificação de deleções próximas às repetições CGG.....</u>	79
3.2.2	<u>Análise para descartar a presença de um cromossomo X extra.....</u>	82
3.2.3	<u>Casos atípicos na população.....</u>	85
3.3	<b>Análise de marcadores epigenéticos por Bioinformática.....</b>	92
3.4	<b>Quantificação de metilação da borda por pirosequenciamento.....</b>	96
3.5	<b>Análise de quantificação de metilação na posição cg22417678 por pirosequenciamento.....</b>	109
3.6	<b>Caso P4210/14.....</b>	118
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	135
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	136
	<b>APÊNDICE A – Dados de perfis mutacionais da amostra de pacientes e familiares incluídos nesse estudo.....</b>	151
	<b>APÊNDICE B – Fotodocumentação da eletroforese realizada com os produtos do ensaio de PCR desenvolvido anteriormente pelo grupo.....</b>	158
	<b>APÊNDICE C – Dados de marcadores nos cromossomos X e Y, internos ao gene <i>SHOX</i>.....</b>	159
	<b>ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE).....</b>	161
	<b>ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	162

## INTRODUÇÃO

A deficiência intelectual (DI) é caracterizada por um funcionamento intelectual significativamente abaixo da média, identificado antes dos 18 anos de idade, com limitações em duas ou mais áreas das habilidades conceituais, sociais e práticas: comunicação (linguagem, leitura, escrita), interação social, empatia, julgamento social, cuidados pessoais, habilidades acadêmicas, de seguir regras e fazer amigos, organização, lazer, trabalho, entre outras (*American Psychiatric Association*, 2017). A prevalência da DI varia entre os estudos, sendo estimada em 2 a 3% da população mundial, constituindo, portanto, um dos mais importantes problemas de saúde pública (Chiurazzi *et al.*, 2008; Ricceri *et al.*, 2014). No Brasil, a prevalência da DI autodeclarada foi de 1,2%, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde 2019 (IBGE, 2021).

A DI é etiologicamente heterogênea, estando associada a fatores ambientais e genéticos (Chelly *et al.*, 2006). Fatores ambientais que podem causar danos no desenvolvimento neurológico incluem diabetes, hipertensão (pré-eclâmpsia e eclâmpsia), epilepsia e asma maternas; exposições pré-natais a compostos neurotóxicos; síndrome alcoólica fetal; infecções pré, peri e pós-natais; deficiências nutricionais durante a gestação; complicações de partos prematuros; asfixia peri e pós-natal ou outros traumas e lesões cerebrais (Huang *et al.*, 2016; Kvarnung & Nordgren, 2017). Já dentre as causas genéticas mais comuns estão desde alterações cromossômicas, tais como aneuploidias e alterações estruturais microscopicamente visíveis (inserções, duplicações, deleções e translocações), até variantes monogênicas, variações no número de cópias gênicas submicroscópicas (microdeleções, microduplicações) e alterações epigenéticas (metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas e regulação por microRNAs, entre outros) (Armatas, 2009; Kvarnung & Nordgren, 2017). Além disso, os aspectos genéticos contribuem para cerca de 50% dos casos, enquanto 25% dos casos estão associados a componentes ambientais e 25% permanecem com causa desconhecida (Marrus & Hall, 2017).

A DI pode ser classificada como branda, moderada e severa, sendo assim categorizada de acordo com a combinação dos níveis de habilidades intelectual e adaptativa com a dependência pessoal necessária (*American Psychiatric*

*Association*, 2017). A gravidade das manifestações clínicas está também relacionada com o fator etiológico associado à DI. Assim, fatores genéticos, como os desequilíbrios cromossômicos e as síndromes genéticas, e ambientais, como infecções e malformações congênitas, se apresentam em casos mais graves. Por outro lado, causas ambientais mais comuns, como deficiências nutricionais maternas, possuem maior influência em casos de DI branda (Patel *et al.*, 2010; Chiurazzi & Pirozzi, 2016). A influência desses fatores varia muito entre os diferentes países e depende do estilo de vida materno e da qualidade dos cuidados de saúde (Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Sendo assim, essa heterogeneidade abrangente dificulta e restringe a identificação das causas envolvidas com a DI (Chelly *et al.*, 2006).

Crianças com DI podem apresentar um amplo espectro de sintomas e sinais clínicos iniciais, dependendo da causa e da severidade da condição (Patel *et al.*, 2010). Dessa forma, crianças com DI mais severa geralmente apresentam sinais mais precocemente reconhecidos, enquanto casos de DI mais branda geralmente se apresentam como um atraso global de desenvolvimento e dificuldade de aprendizado e, com isso, são diagnosticados relativamente mais tarde (Patel *et al.*, 2010). Em geral, os pais relatam alguns dos sinais mais comuns da DI quando observam que seus filhos demoram a sentar, engatinhar ou andar, demoram a falar ou apresentam alterações da fala, têm dificuldades de memória ou compreensão do resultado de suas ações ou em solucionar problemas (Patel *et al.*, 2010; *Centers for Disease Control and Prevention*, 2019).

O diagnóstico clínico é realizado de acordo com os sintomas comportamentais e os marcos de desenvolvimento, seguido de exames físicos, neurológicos, de dismorfologia e de imagem (Patel *et al.*, 2010). Em muitos casos de DI branda, não há uma causa específica clara e, com isso, não há um consenso em relação à necessidade de se estabelecer a etiologia do diagnóstico (Patel *et al.*, 2010). Entretanto, conforme o aumento da severidade da condição, a busca e a possibilidade de se determinar a causa específica também aumenta, visto que a DI moderada e grave podem estar mais relacionadas a síndromes genéticas (Patel *et al.*, 2010).

Clinicamente, a DI pode ser dividida em duas formas: DI sindrômica (DI-S) e não sindrômica (DI-NS) (Kaufman *et al.*, 2010; Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Na forma sindrômica, os indivíduos apresentam outras características além da DI, com aspectos clínicos radiológicos, metabólicos ou biológicos associados à condição

(Kaufman *et al.*, 2010; Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Por outro lado, as formas não sindrômicas têm sido definidas pela presença da DI como única característica clínica (Kaufman *et al.*, 2010). Entretanto, autismo, epilepsia e déficits neuromusculares são comuns na DI não sindrômica (Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Além disso, é possível observar que para alguns genes, algumas variantes podem causar uma síndrome, enquanto outras podem levar a uma forma não sindrômica da DI (Chiurazzi & Pirozzi, 2016). Dessa forma, distinguir as formas DI-S e DI-NS em nível molecular é um grande desafio.

O fato da DI apresentar uma prevalência cerca de 30% maior em indivíduos do sexo masculino levou à suspeita de que alterações em genes localizados no cromossomo X teriam grande contribuição para esta condição (Leonard & Wen, 2002; Patel *et al.*, 2010; Lubs *et al.*, 2012). Isso se dá em função das alterações em genes do cromossomo X em homens, hemizigotos para esses genes, serem mais aparentes fenotipicamente do que em mulheres. Nestas, alterações recessivas podem ser mascaradas pela heterozigose e ainda pode haver compensação de dose favorável à expressão do alelo normal pela inativação desviada do cromossomo X (Lyon, 1961; Stevenson & Schwartz, 2009). De fato, estudos posteriores descreveram casos familiares de DI com padrão de herança ligado ao cromossomo X, reforçando essa hipótese (Lubs *et al.*, 2012; Stevenson *et al.*, 2012). Além disso, apesar desse cromossomo representar apenas 5% do genoma humano, cerca de 15% de seus genes são reconhecidos por estarem associados à DI e atuarem em diversas funções essenciais do Sistema Nervoso Central (SNC), como a plasticidade neuronal, aprendizado, memória e cognição (Ropers, 2006; Neri *et al.*, 2018).

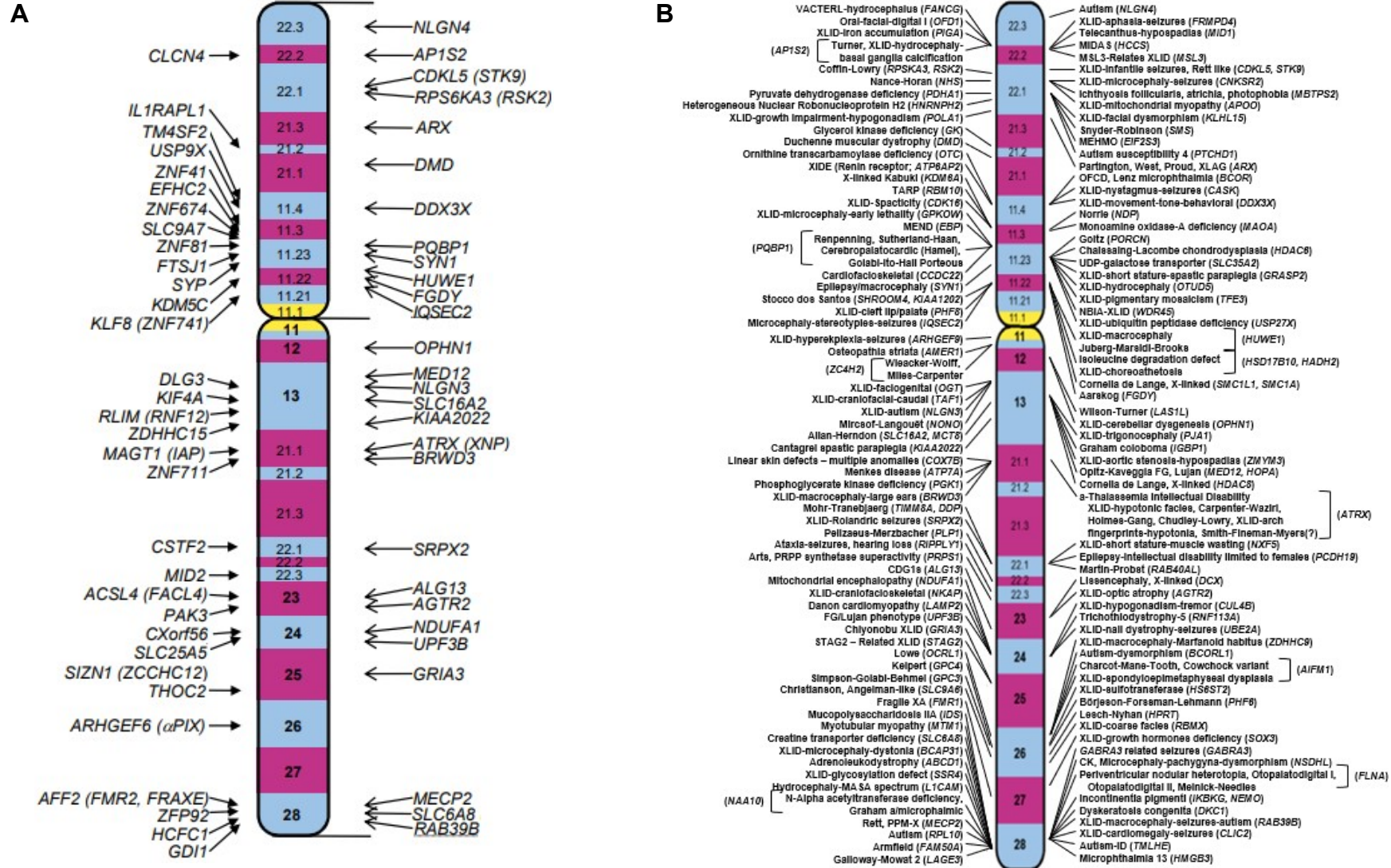
A DI ligada ao cromossomo X (DILX) é definida pela presença de DI ou dificuldade de aprendizado, cuja causa genética está localizada ou há suspeita de que se localize ao longo do cromossomo X (Géczy *et al.*, 2009). A DILX representa aproximadamente 5 a 10% de todas as formas de DI em homens (Bassani *et al.*, 2013).

Clinicamente, a DILX também pode ser dividida em DILX sindrômica (DILX-S) e DILX não sindrômica (DILX-NS), seguindo os mesmos padrões para DI-S e DI-NS (Mandel & Chelly, 2004; Greenwood Genetic Center, 2021). Ou seja, a DILX-S é baseada em características físicas, metabólicas e/ou comportamentais típicas em adição à DI (Géczy *et al.*, 2009), enquanto que na DILX-NS não há sinais dismórficos,



metabólicos ou neuromusculares consistentes (Gécz *et al.*, 2009). Atualmente, já foram identificados 162 genes envolvidos na DILX (Greenwood Genetic Center, 2021) (Figura 1). No entanto, acredita-se que grande parte dos mecanismos moleculares subjacentes à DILX ainda seja desconhecida, o que contribui para uma alta taxa de subdiagnóstico (Lubs *et al.*, 2012).

Figura 1 – Genes no cromossomo X associados à DI



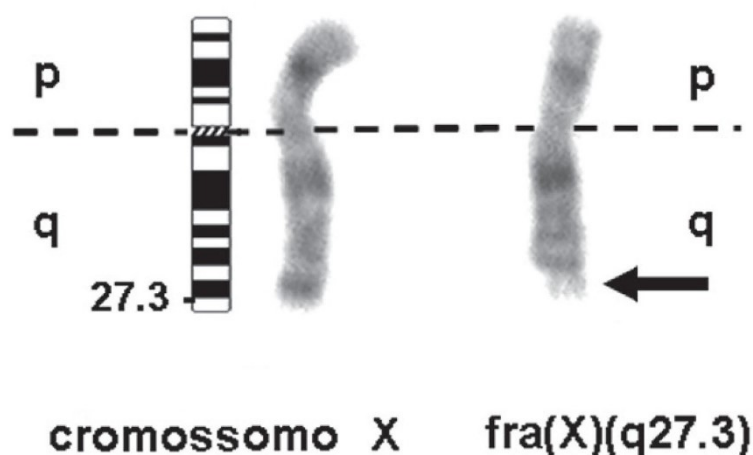
Legenda: (A) genes associados à DILX-NS; (B) genes associados à DILX-S.

Fonte: adaptada de Greenwood Genetic Center, 2021.

## Síndrome do X Frágil (SXF)

A forma mais frequente de DILX sindrômica é a síndrome do X Frágil (SXF; OMIM #300624), descrita pela primeira vez em 1943, por Martin e Bell (Martin & Bell, 1943; Saldarriaga *et al.*, 2014). Quase três décadas depois, Lubs descreveu um caso semelhante em uma família com segregação ligada ao cromossomo X (Lubs, 1969). De acordo com Lubs (1969), o cromossomo X dos indivíduos afetados em metáfase possuía um sítio frágil na porção terminal do braço longo do cromossomo X (Figura 2). A condição passou então a ser conhecida como Síndrome do X Frágil. Atualmente, SXF é a segunda causa de DI mais comum (2,4% dos casos de DI), depois da síndrome de Down, e a mais prevalente em homens (Hagerman & Hagerman, 2002; Hunter *et al.*, 2014). A prevalência da SXF na população em geral é estimada em 1 em 4000 homens e 1 em 6000 mulheres (Crawford *et al.*, 2001; *National Fragile X Foundation*, 2021).

Figura 2 – Cariótipo parcial por bandeamento GTG, mostrando o cromossomo X de indivíduo sem a SXF em comparação com um indivíduo com o sítio frágil relacionado à SXF [fra(X)(q27.3)]



Fonte: adaptada de Floriani *et al.*, 2017.

Bebês com a SXF geralmente apresentam hipotonia, com dificuldade de sucção inicial e frequente regurgitação (Hagerman *et al.*, 2010; 2017). Por volta dos dois anos, diversas crianças com essa condição apresentam atraso no desenvolvimento da linguagem, hiperatividade, ansiedade e reatividade sensorial exacerbada (Hagerman *et al.*, 2002; 2017; Berry-Kravis *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2011; Hogan *et al.*, 2017). Geralmente, o diagnóstico clínico da síndrome acontece quando a criança desenvolve atraso ou ausência da fala (Bailey *et al.*, 2009). Outros sinais clínicos que podem estar presentes em crianças pequenas são: atraso motor, hábito de agitar e morder as mãos, pouco contato ocular, otite média frequente e irritabilidade (Sullivan *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2011).

Meninos com SXF apresentam um fenótipo clássico caracterizado por face alongada, orelhas grandes e salientes, fronte proeminente e macroorquidismo pós-puberal (Hagerman *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2014; *National Fragile X Foundation*, 2021). Os pacientes são frequentemente acometidos por problemas mentais relacionados, como ansiedade e depressão, presentes em um a mais de dois terços dos indivíduos afetados (Bailey *et al.*, 2009; Ciaccio *et al.*, 2017). Além disso, observa-se também problemas de atenção e hiperatividade em mais de 80% dos casos e comportamento autodestrutivo e agressão em mais de 50% de crianças e adolescentes com a síndrome (Sullivan *et al.*, 2006; Hagerman *et al.*, 2009; Ciaccio *et al.*, 2017). Ainda, em muitos casos, crianças e adultos acometidos ainda podem demonstrar deficiência em habilidades funcionais (como em se alimentar, se vestir e se comunicar) (Bailey *et al.*, 2009). Além disso, entre 25 e 50% das crianças e adolescentes com a SXF se enquadram nos critérios de diagnóstico dos transtornos do espectro autista, com habilidades adaptativas reduzidas e desenvolvimento mais lento da linguagem (Philofsky *et al.*, 2004; Ciaccio *et al.*, 2017).

## Gene *FMR1*

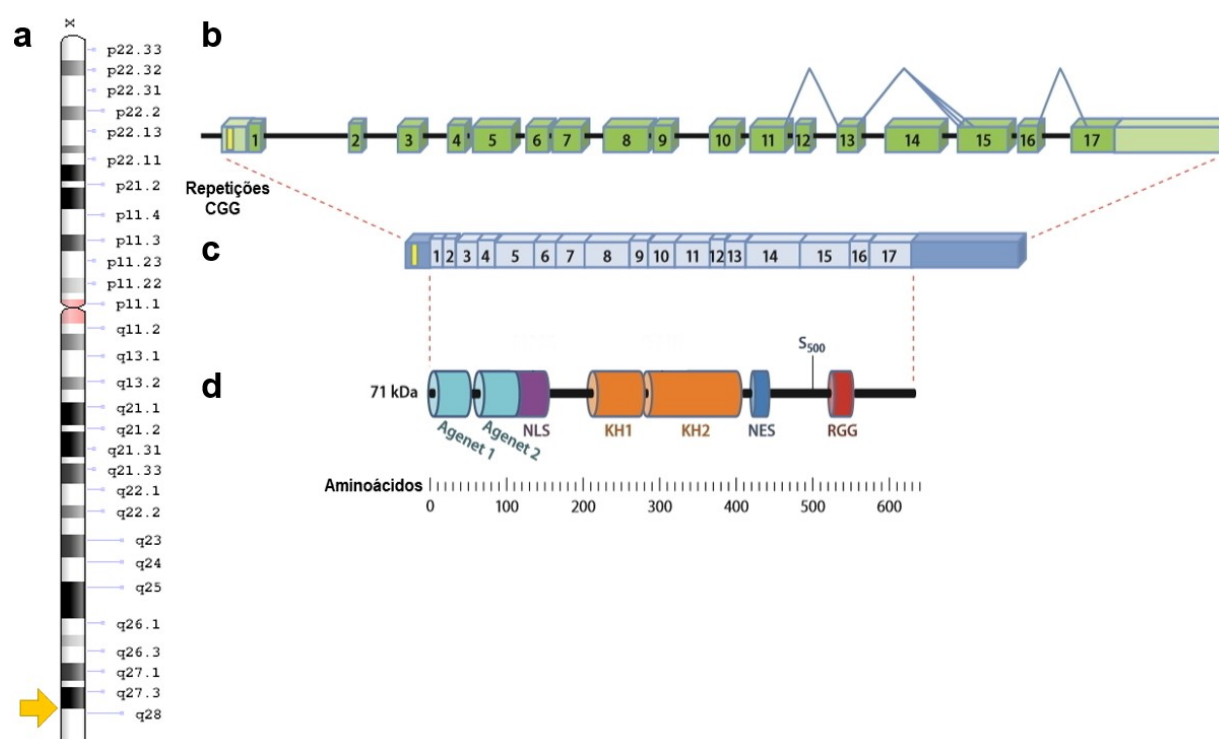
O gene *Fragile X Mental Retardation 1* (*FMR1*, OMIM #309550) é constituído por 17 éxons, compreendendo aproximadamente 38 kb de extensão, e está localizado em Xq27.3 (Verkerk *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1993; Handt *et al.*, 2014). Em termos moleculares, a SXF se caracteriza por uma mutação dinâmica, em consequência da expansão instável de uma sequência de trinucleotídeos CGG repetida em *tandem* na região 5' não traduzida (5' UTR) do gene *FMR1*, próxima à região promotora (Oberlé *et al.*, 1991; Cleary & Pearson, 2005; Saldarriaga *et al.*, 2014; Hagerman *et al.*, 2017; Nolin *et al.*, 2019). As mutações dinâmicas ocorrem em regiões do DNA onde há sequências repetidas *em tandem* (Cleary & Pearson, 2005), como a encontrada na região 5' UTR do gene *FMR1*. Normalmente, o número de repetições é polimórfico na população e transmitido de maneira estável ao longo das gerações (Cleary & Pearson, 2005). Entretanto, quando ocorre uma expansão que ultrapassa determinado limiar, elas se tornam instáveis, podendo aumentar de comprimento através de sucessivas gerações até que o número de repetições atinja um tamanho patogênico (Cleary & Pearson, 2005).

Com a variabilidade polimórfica nesta região, podem ser reconhecidas quatro categorias alélicas distintas: (a) normal (até 44 repetições CGG), com os alelos mais comuns nessa faixa sendo os de 29 e 30 repetições e transmissão estável; (b) alelos intermediários (45 a 54 repetições), sem capacidade de se expandir para a mutação completa, mas sendo levemente instáveis e considerados como precursores dos alelos pré-mutados; (c) pré-mutação (55 a 200 CGGs), sendo altamente instáveis quando herdados por via materna; e (d) mutação completa (acima de 200 CGGs), derivados de alelos pré-mutados herdados da mãe (Fu *et al.*, 1991; Nolin *et al.*, 2003; Fernandez-Carvajal *et al.*, 2009; Saldarriaga *et al.*, 2014; Spector *et al.*, 2021).

Nos indivíduos afetados pela SXF, o número de repetições CGG está na faixa de mutação completa, ou seja, acima de 200 CGGs (Wang *et al.*, 2012; Spector *et al.*, 2021). A expansão na faixa de mutação completa tem como consequência o silenciamento epigenético do gene *FMR1*, através da hipermetilação das repetições CGG e da região promotora do gene que resulta em perda completa ou quase completa de seu produto final, a proteína FMRP (Figura 3) (Wang *et al.*,

2012; Ciaccio *et al.*, 2017). Por outro lado, níveis elevados do RNAm transcrito pelo gene *FMR1* são observados em portadores da pré-mutação, o que leva a uma toxicidade em células neurais (Raske & Hagerman, 2009). No entanto, os níveis da proteína FMRP são mais baixos em portadores da pré-mutação do que em indivíduos normais (Figura 4) (Santoro *et al.*, 2012).

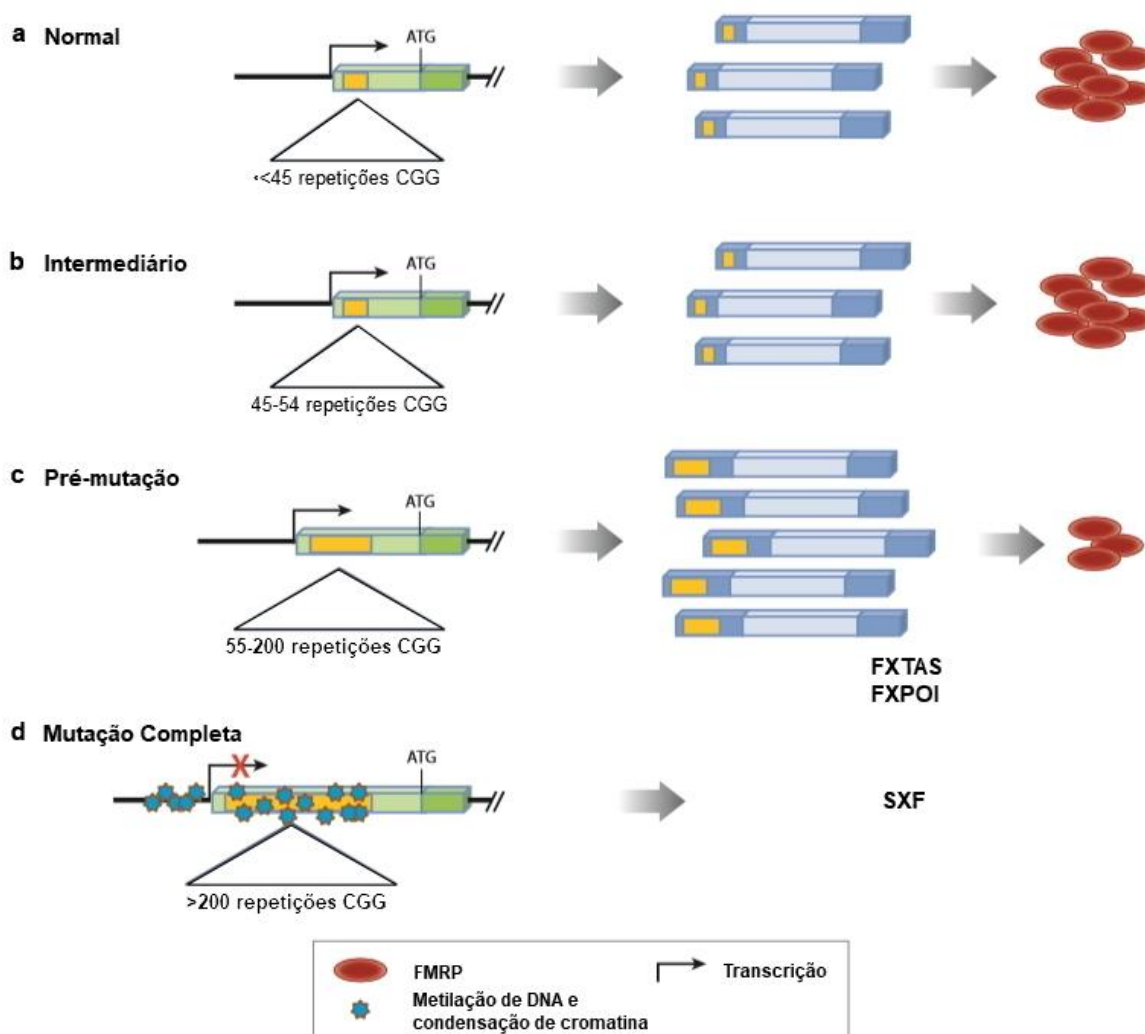
Figura 3 – Localização cromossômica e estrutura do gene *FMR1*, seu principal transcrito e a proteína FMRP



Legenda: (a) Representação do cromossomo X. Sete amarela aponta para a posição do sítio frágil e gene *FMR1*; (b) Esquema do gene *FMR1* e seus 17 exons, com os exons codificantes em verde escuro, as regiões não traduzidas em verde claro, e a região de repetições CGG em amarelo. (c) Principal transcrito de RNAm do gene *FMR1*, com todos os exons representados em azul claro e posicionados acima de seus aminoácidos correspondentes. (d) Proteína FMRP, seus principais domínios funcionais e abaixo, a extensão dos aminoácidos. Agenet 1 e 2: domínios Agenet de ligação à cromatina; NLS: sinal de localização nuclear, KH1 e KH2: domínios de homologia K 1 e 2; NES: sinal de exportação nuclear; RGG: box arginina-glicina-glicina de ligação a RNA; S<sub>500</sub>: serina fosforilada primária.

Fonte: adaptada de Santoro *et al.*, 2012 e U.S. National Library of Medicine, 2020.

Figura 4 – Quatro classes alélicas encontradas na região 5' UTR do gene *FMR1* e suas consequências funcionais



Legenda: (a) Alelo normal ( $\leq 44$  repetições) permite uma transcrição fisiológica apropriada do gene *FMR1* e tradução da proteína FMRP, (b) assim como o alelo intermediário (45-54 repetições). (c) Alelo de pré-mutação (55-200 repetições) causa um aumento significativo na transcrição do *FMR1*. No entanto, os níveis da proteína são mais baixos que em indivíduos saudáveis. Níveis mais altos do RNAm do gene *FMR1* estão relacionados com a Síndrome de Tremor e Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS) e a Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X Frágil (FXPOI), provavelmente devido ao efeito tóxico causado por pelo acúmulo destas moléculas em células neurais. (d) Alelo de mutação completa (>200 repetições) levando a mudanças epigenéticas nas repetições CGG e no promotor do *FMR1*, assim como ao silenciamento transcripcional do gene. Os sintomas da SXF são causados pela falta da proteína FMRP. A classificação das categorias alélicas está de acordo com a *American College of Medical Genetics* (Monaghan *et al.*, 2013; Spector *et al.*, 2021).

Fonte: Adaptada de Santoro *et al.*, 2012.

A proteína FMRP apresenta ligação seletiva a RNA e regula negativamente a tradução dos mRNAs a ela ligados, especialmente nas sinapses neuronais (Wang *et al.*, 2012; Noto *et al.*, 2016; Hagerman *et al.*, 2017). É produzida em vários



tecidos, sendo expressa em maiores níveis no início do desenvolvimento embrionário (Kumari *et al.*, 2010). Assim, é uma proteína essencial para o desenvolvimento neuronal e intelectual (Kumari *et al.*, 2010). Além disso, um estudo identificou RNAs mensageiros prováveis de interagir com a FMRP provenientes de genes candidatos ao autismo (Darnell *et al.*, 2011).

A FMRP é uma proteína bastante conservada em mamíferos e sua isoforma principal possui 71 KDa (Blackwell *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2020). Essa proteína interage com elementos de RNA, se ligando a eles através de sequências específicas mediadas pelos domínios funcionais do tipo KH e um do tipo RGG (Blackwell *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2011). Além disso, ela pode formar homodímeros que interagem com diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares envolvidas no metabolismo de RNAm, incluindo RNA de interferência (RNAi) e edição de RNA (Caudy *et al.*, 2002; Ishizuka *et al.*, 2002; Bhogal *et al.*, 2011; Tabolacci *et al.*, 2016a).

A FMRP também apresenta a função de regular a tradução e a estabilidade de RNAm de diversos genes envolvendo os domínios do sinal de localização nuclear (NLS) e do sinal de exportação nuclear (NES), importantes para o transporte do núcleo para o citoplasma e do citoplasma para o núcleo (Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Darnell *et al.*, 2011; Saldarriaga *et al.*, 2014; Tabolacci *et al.*, 2016a). É capaz de regular a síntese de proteínas locais importantes para o desenvolvimento das espinhas dendríticas e na plasticidade sináptica, essenciais para o aprendizado e o desenvolvimento intelectual, através do mecanismo de RNAi (Antar & Bassell, 2003, Antar *et al.*, 2005; Healy *et al.*, 2011; Peprah *et al.*, 2012). Ela ainda tem o papel de remodelar o citoesqueleto através das regiões central e N-terminal, onde estão presentes dois domínios Agenet capazes de se ligar a resíduos de lisina trimetilados, e de formar grandes ribonucleopartículas citoplasmáticas contendo diversas proteínas e RNAs (Maurer-Stroh *et al.*, 2003; Bagni & Greenough, 2005; Adams-Cioaba *et al.*, 2010; Bagni *et al.*, 2012; De Rubeis *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

A mutação completa surge através da expansão de uma pré-mutação materna (Healy *et al.*, 2011). Sendo assim, mães portadoras de pré-mutação em heterozigose podem ter filhos normais, portadores da pré-mutação ou da mutação completa (Healy *et al.*, 2011). De acordo com Nolin e colaboradores (2003), o risco de expansão de uma pré-mutação materna para a mutação completa nos filhos



depende da extensão das repetições CGG e a chance é próxima de 100% para mulheres portadoras de pré-mutação com mais de 99 repetições (Quadro 1).

Quadro 1 – Probabilidade de surgimento do alelo de mutação completa no gene *FMR1* na prole, de acordo com a extensão das repetições do alelo de pré-mutação materna

<b>Número de repetições CGG do alelo materno</b>	<b>Probabilidade de expansão para mutação completa na prole</b>
55-59	3,7%
60-69	5,3%
70-79	31,1%
80-89	57,8%
90-99	80,1%
100-109	100,0%
110-119	98,1%
120-129	97,2%
130-139	94,4%
140-149	100,0%
150-159	100,0%
160-169	100,0%
170-199	100,0%

Fonte: Adaptada de Nolin *et al.*, 2003.

Homens portadores de pré-mutação terão apenas filhas portadoras da pré-mutação, visto que o homem transmite o cromossomo Y a seus filhos (Healy *et al.*, 2011; Saldarriaga *et al.*, 2014). O alelo da pré-mutação não tende a se expandir quando transmitida por via paterna, devido a uma pressão seletiva sobre os gametas masculinos (Saldarriaga *et al.*, 2014). Há apenas raros relatos de transmissão da mutação completa por via paterna (Zeesman *et al.*, 2004; Alvarez-Mora *et al.*, 2017; Nolin *et al.*, 2019). Apesar de homens com mutação completa geralmente não deixarem descendentes, devido às suas limitações cognitivas, estudos em esperma indicam ainda que as filhas herdariam a pré-mutação e não a mutação completa (Willems *et al.*, 1992; Reyniers *et al.*, 1993; Nolin *et al.*, 2019). Ainda, variantes pontuais ou *frameshift* no *FMR1* também podem acarretar em um fenótipo de SXF,

embora representem menos de 1% dos casos já descritos (Handt *et al.*, 2014; Saldarriaga *et al.*, 2014).

Além do tamanho da repetição e do gênero do transmissor do alelo expandido, há mais um fator que contribui para a instabilidade nos alelos pré-mutados: a ausência de trinucleotídeos AGGs interrompendo as repetições CGG (Nolin *et al.*, 2019). Estudos mostram que essas interrupções funcionam como um fator de proteção, diminuindo o risco de expansão entre gerações (Yrigollen *et al.*, 2012; Nolin *et al.*, 2013; 2015; 2019). No começo dos anos 90, análises revelaram que a estrutura do alelo na categoria normal mais comum inclui uma repetição AGG no 10º ou 11º trinucleotídeo CGG e outra próximo ao 20º CGG (Eichler *et al.*, 1994; Gunter *et al.*, 1998; Hirst *et al.*, 1994; Kunst *et al.*, 1996; Kunst & Warren, 1994; Snow *et al.*, 1994). Entretanto, Eichler e colaboradores (1994) hipotetizaram que longas sequências de repetição sem interrupções em alelos pré-mutados e tratados com mais de cerca de 34 CGGs ininterruptas podem contribuir para a instabilidade em alelos menores também. De fato, estudos recentes demonstraram que alelos de pré-mutação sem AGGs representam um risco para a expansão para a mutação completa na geração seguinte, enquanto alelos que incluem esse trinucleotídeo estão associados com uma maior estabilidade da repetição entre gerações (Yrigollen *et al.*, 2012; Nolin *et al.*, 2013; Nolin *et al.*, 2015; Villate *et al.*, 2020).

Nolin e colaboradores (2019) mostraram ainda que, enquanto muitas transmissões instáveis levam a expansões, contrações para alelos menores também podem ser observadas, mesmo que mais raramente. Em sua pesquisa com mais de 5 mil transmissões, eles constataram que, entre os alelos pré-mutados, contrações transmitidas por via paterna são até 10 vezes mais comuns do que por via materna e, que a frequência de contrações paternas aumenta de acordo com o tamanho da repetição (Quadro 2) (Nolin *et al.*, 2019). No entanto, todas as contrações transmitidas por pais pré-mutados resultaram em alelos menores ainda na faixa de pré-mutação, enquanto contrações maternas resultaram em alelos normais ou intermediários em 40% dos casos (Nolin *et al.*, 2019). Além disso, a perda de interrupções AGGs foi observada apenas em contrações de pré-mutação materna, ocorrendo em uma frequência relativamente alta (Nolin *et al.*, 2019). Sendo assim, os autores sugeriram que muitos alelos normais sem interrupções AGGs tenham origem em contrações de alelos pré-mutados maternos (Nolin *et al.*, 2019).

Quadro 2 – Contrações observadas no alelo transmitido por vias materna e paterna, de acordo com Nolin e colaboradores (2019)

<b>Número de repetições CGG do alelo parental</b>	<b>Contração do alelo materno</b>	<b>Contração do alelo paterno</b>
<45	0,0%	0,08%
45-54	2,0%	0,0%
55-64	1,8%	4,5%
65-74	4,4%	9,4%
75-84	7,1%	26,3%
85-94	4,5%	37,0%
≥95	1,4%	70,8%

Legenda: ≤44 CGGs: alelo normal; 45-54 CGGs: alelo intermediário; >55: alelo pré-mutado.  
Fonte: Adaptada de Nolin *et al.*, 2019.

Portadores da pré-mutação não apresentam o fenótipo clássico da SXF, mas podem exibir outros quadros clínicos, psiquiátricos e neurológicos (Saldarriaga *et al.*, 2014). Estes quadros, chamados de FRAXopatias, incluem a Insuficiência Ovariana Prematura Associada ao X Frágil (FXPOI, OMIM #311360), caracterizada por redução na função ovariana antes dos 40 anos (Sherman, 2000; Man *et al.*, 2017; Hunter *et al.*, 2019) e a Síndrome de Tremor e Ataxia Associada ao X Frágil (FXTAS, OMIM #300623), uma condição neurodegenerativa de manifestação tardia, mais prevalente em homens pré-mutados (Hagerman *et al.*, 2001; Hagerman & Hagerman, 2004; Hagerman *et al.*, 2018; Hall & Berry-Kravis, 2018; Hunter *et al.*, 2019). Além disso, apesar dos alelos intermediários serem considerados como fenotipicamente normais, esses alelos têm sido associados a necessidades especiais em crianças, parkinsonismo em adultos e FXPOI/FXTAS em alguns casos (Bodega *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2012; 2020).

### **Perfis Atípicos na SXF**

A instabilidade presente nas repetições CGGs expandidas pode gerar mosaicismos de tamanho, ou seja, pode resultar na presença de alelos com diferentes extensões (Nolin *et al.*, 1994; Pretto *et al.*, 2014; Jiraanont *et al.*, 2017).

Com isso, o alelo de mutação completa pode aparecer concomitantemente a alelos de pré-mutação em diferentes tipos celulares (Nolin *et al.*, 1994; Pretto *et al.*, 2014). Além disso, apesar de não serem muito comuns, mosaicismos de tamanho compreendendo alelos de mutação completa e um alelo normal têm sido descrito em diferentes casos de meninos com SXF (Nolin *et al.*, 1994; Todorov *et al.*, 2009; Bonarrigo *et al.*, 2014).

Há alguns anos, sugeriu-se que o mosaicismo de tamanho para a mutação completa e alelo normal poderia se originar durante os estágios iniciais do desenvolvimento, quando alelos pré-mutados transmitidos por via materna podem resultar em expansão para a mutação completa, assim como, menos frequentemente, em contração para o alelo normal (Zhao & Usdin, 2016). Na literatura, há ainda descrição de casos de mosaicismo incluindo alelos normais e intermediários (Jiraanont *et al.*, 2017). O mosaicismo de tamanho representa uma forma de variabilidade fenotípica, em que casos mosaicos apresentam valores de QI superiores aos pacientes com apenas a mutação completa, e pode ser observado em ambos os sexos, com uma incidência maior no sexo masculino (Schneider *et al.*, 2013; Ciaccio *et al.*, 2017).

Além disso, alguns indivíduos ainda exibem o que é chamado de mosaicismo de metilação, que ocorre quando algumas células apresentam alelos metilados e outras carregam alelos não metilados (com número de repetições CGGs variando entre pré-mutação e mutação completa) (Hagerman *et al.*, 1994; Genc *et al.*, 2000). Nesses casos, o nível de metilação pode variar, gerando mosaicismos intra ou inter-tecidos (Hagerman *et al.*, 1994; Genc *et al.*, 2000). Esses alelos não metilados são transcritos e, em muitos casos, superexpressos e potencialmente traduzidos na proteína FMRP (Tassone *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2014). No entanto, os níveis de expressão são inversamente relacionados com o número de repetições e os alelos, em particular os de pré-mutação maiores, mostram uma expressão reduzida, possivelmente devido ao déficit na eficiência de tradução da proteína FMRP (Primerano *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2005; Peprah *et al.*, 2010).

O espectro de mosaicismos na SXF ainda pode ser complementado pela presença de deleções no gene *FMR1*, concomitantes a alelos FM (Nolin *et al.*, 1994; Coffee *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2006). Nos casos em que deleções menores envolvem a remoção da região promotora ou afetam o sítio de início de transcrição do *FMR1*, a proteína FMRP não será produzida e o indivíduo desenvolve a SXF

(Jiraanont *et al.*, 2017). Em alguns casos, as deleções estão limitadas à região entre o sítio de início da transcrição e o códon de iniciação da tradução e, sendo assim, esses alelos ainda apresentam a capacidade de produzir RNAm (de Graaff *et al.*, 1996; Grønskov *et al.*, 1997; Kenneson *et al.*, 2001).

Devido principalmente à dificuldade de se amplificar produtos repetitivos longos e regiões ricas em CG, a investigação molecular da SXF é complexa. Mesmo diante de metodologias de alto rendimento, a abordagem destas regiões repetitivas ainda representa um grande desafio. Através do uso combinado de diferentes abordagens metodológicas, nosso grupo demonstrou recentemente a existência de padrões mutacionais atípicos e subdetectados, envolvendo mosaicismos somáticos de mutação completa e deleção no gene *FMR1* em indivíduos com a SXF (Gonçalves *et al.*, 2016). Os dados apontaram que as deleções surgiram no início do desenvolvimento embrionário, foram causadas pela presença de microhomologia entre as regiões proximal e distal dos pontos de quebra e eram clinicamente indistinguíveis do padrão fenotípico clássico da SXF (Gonçalves *et al.*, 2016). No entanto, não se sabe ainda que característica da arquitetura genômica faz com que uma mutação completa seja revertida para a deleção durante o início do desenvolvimento embrionário, enquanto outras não (Gonçalves *et al.*, 2016). Além disso, o significado clínico e as implicações terapêuticas destes padrões atípicos ainda são desconhecidos, tendo em vista que em geral apenas a expansão das repetições CGG é interrogada (Gonçalves *et al.*, 2016).

### **Epigenética do gene *FMR1***

A expansão das repetições CGG na faixa de mutação completa (>200 repetições) desencadeia uma cascata de eventos epigenéticos, com a propagação da metilação de DNA para a região promotora do gene *FMR1* (Oberlé *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2012; Jiraanont *et al.*, 2017; Kraan *et al.*, 2019), juntamente com modificações de histonas ativas para repressivas (Coffee *et al.*, 1999; 2002; Pietrobono *et al.*, 2005; Tabolacci *et al.*, 2005; 2008a; Kumari & Usdin, 2010). Acredita-se que o evento de silenciamento do gene *FMR1* seja mediado pela formação de estruturas secundárias de DNA e/ou RNA, que afetam o equilíbrio entre

os fatores que favorecem uma configuração de cromatina ativa e os fatores que contribuem para uma configuração de cromatina fechada (Usdin & Kumari, 2015; Kraan *et al.*, 2019).

Em indivíduos não acometidos pela SXF e com alelos de tamanho normal, o promotor se encontra não metilado e a cromatina associada é enriquecida com marcadores de cromatina ativos (como histonas H3 e H4 acetiladas e histona H3 trimetilada na lisina 4) e apresenta poucos marcadores de cromatina inibitórios (como histona H3 trimetilada na lisina 9), permitindo o acesso de fatores de transcrição ao promotor do gene (Kraan *et al.*, 2019). Já em indivíduos com a SXF, a metilação de DNA atinge o promotor e as repetições CGG e a cromatina adota uma conformação compactada enriquecida com marcadores de cromatina inativa (como histona H3 hipometilada na lisina 4, histona H3 dimetilada e trimetilada na lisina 9 e na lisina 27, histona H4 trimetilada na lisina 20), impossibilitando o acesso ao promotor (Kumari & Usdin, 2010; Kraan *et al.*, 2019).

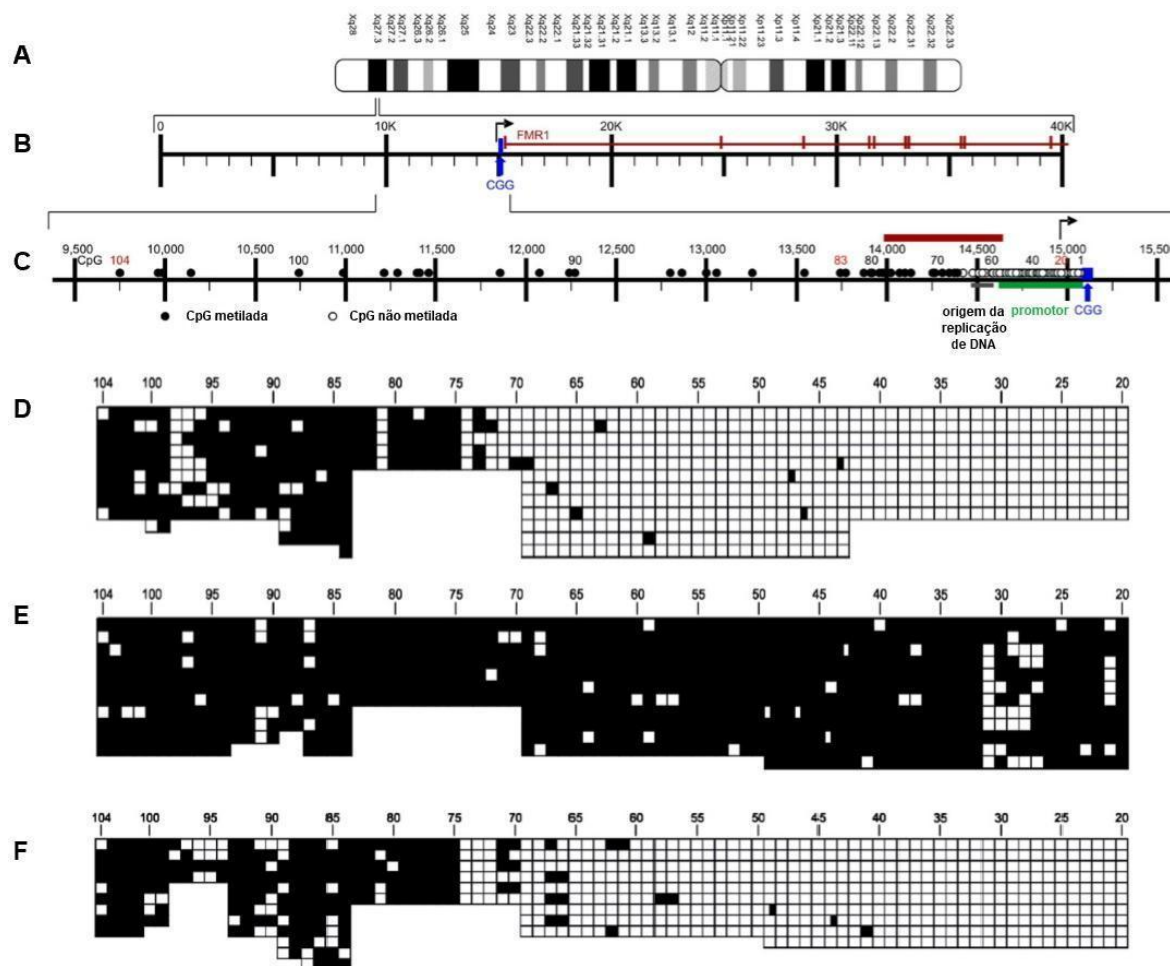
A metilação do alelo de mutação completa ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, aproximadamente na 11<sup>a</sup> semana de gestação, e pode apresentar um papel na estabilidade das repetições expandidas (Willemsen *et al.*, 2002). Nas células germinativas iniciais de fetos com mutação completa, as repetições expandidas não estão metiladas, enquanto que nas vilosidades coriônicas desses fetos são metiladas em um grau crescente à medida que o desenvolvimento progride, ou seja, há uma relação com a diferenciação celular (Malter *et al.*, 1997). Além disso, uma ilha CpG, isto é, uma região rica em CpGs, localizada a aproximadamente 250 pares de bases à montante das sequências repetidas também se mostra metilada na presença da expansão (Coffee *et al.*, 1999).

Ainda, RNAs não codificantes (ncRNA) participam da fisiopatologia da SXF através de múltiplos aspectos (Zhou *et al.*, 2019). Os microRNAs (miRNA), por exemplo, facilitam principalmente o papel do FMRP como repressor traducional, moldando a plasticidade sináptica, controlando o crescimento do axônio e regulando o nível de FMRP endógeno (Zhou *et al.*, 2019). Entretanto, a forma precisa como a adição de repetições resulta na indução de marcadores de repressão epigenética e a sequência de eventos envolvidos ainda permanecem por serem elucidadas e, assim, o gatilho para o silenciamento do gene *FMR1* segue sendo uma questão não resolvida (Usdin *et al.*, 2014; Epsztejn-Litman & Eiges, 2019).

## Borda de metilação no gene *FMR1*

Mais um ponto que também não está claro é o porquê de um número de repetições de 200 ser requerido para que o processo de silenciamento epigenético seja engatilhado. Neste sentido, dados recentes da literatura têm apontado para a presença de uma borda de metilação, localizada 650-800 nucleotídeos e 65-70 CpGs à montante das repetições CGG e detectada por sequenciamento de DNA tratado com bisulfito de sódio (Naumann *et al.*, 2009; 2014). Essa zona de transição, presente em indivíduos normais, separa um segmento de genoma fortemente ou completamente metilado de uma região livre de metilação, a qual abrange o promotor do gene *FMR1* (Naumann *et al.*, 2009; 2014). Já em pacientes com a SXF, com a instabilidade provocada pelo alto número de repetições CGG, essa borda é perdida. Com isso, uma metilação *de novo* se dissemina até a região promotora do gene, levando à sua inativação (Naumann *et al.*, 2009; 2014). Em indivíduos do sexo masculino altamente funcionais (HFMs; *high functioning males*), ou seja, que apresentam expansão CGG acima de 200 sem metilação na região de repetição e sem comprometimento intelectual, a borda de metilação se apresenta inalterada (Figura 5) (Naumann *et al.*, 2014; Tabolacci *et al.*, 2016b).

Figura 5 – Perfis de metilação na região promotora do gene *FMR1* e na região 5' UTR em linhagens celulares de homens com e sem SXF e em homens altamente funcionais



Legenda: (a) Ideograma do cromossomo X humano. (b) Mapa parcial mostra os primeiros 10 exons (barras verticais) e introns do gene *FMR1*, além do segmento do genoma à montante, incluindo as repetições CGG. (c) Mapa da região 5' a montante do gene *FMR1*. O esquema apresenta todos os dinucleotídeos CpGs (1 a 104) na região: a seta indica o sítio de início da transcrição. O promotor e a origem da replicação de DNA também estão indicados. A borda entre os dinucleotídeos CpG metilados e não metilados está marcada pelos símbolos ● e ○, respectivamente, e está designada por uma barra vermelha. Região da borda de metilação CpG 5' à montante do promotor do gene *FMR1* em DNA extraído de (d) fibroblastos transformados pelo gene da telomerase de homens sem SXF, (e) células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) não transformadas de paciente com SXF e (f) fibroblastos transformados pelo gene da telomerase de homens HFM (*high functioning male*), ou seja, homens com expansão CGG acima de 200 sem metilação na região de repetição e sem comprometimento intelectual. Os números 20-104 designam os dinucleotídeos CpG na região: ■ metilados e □ não metilados.

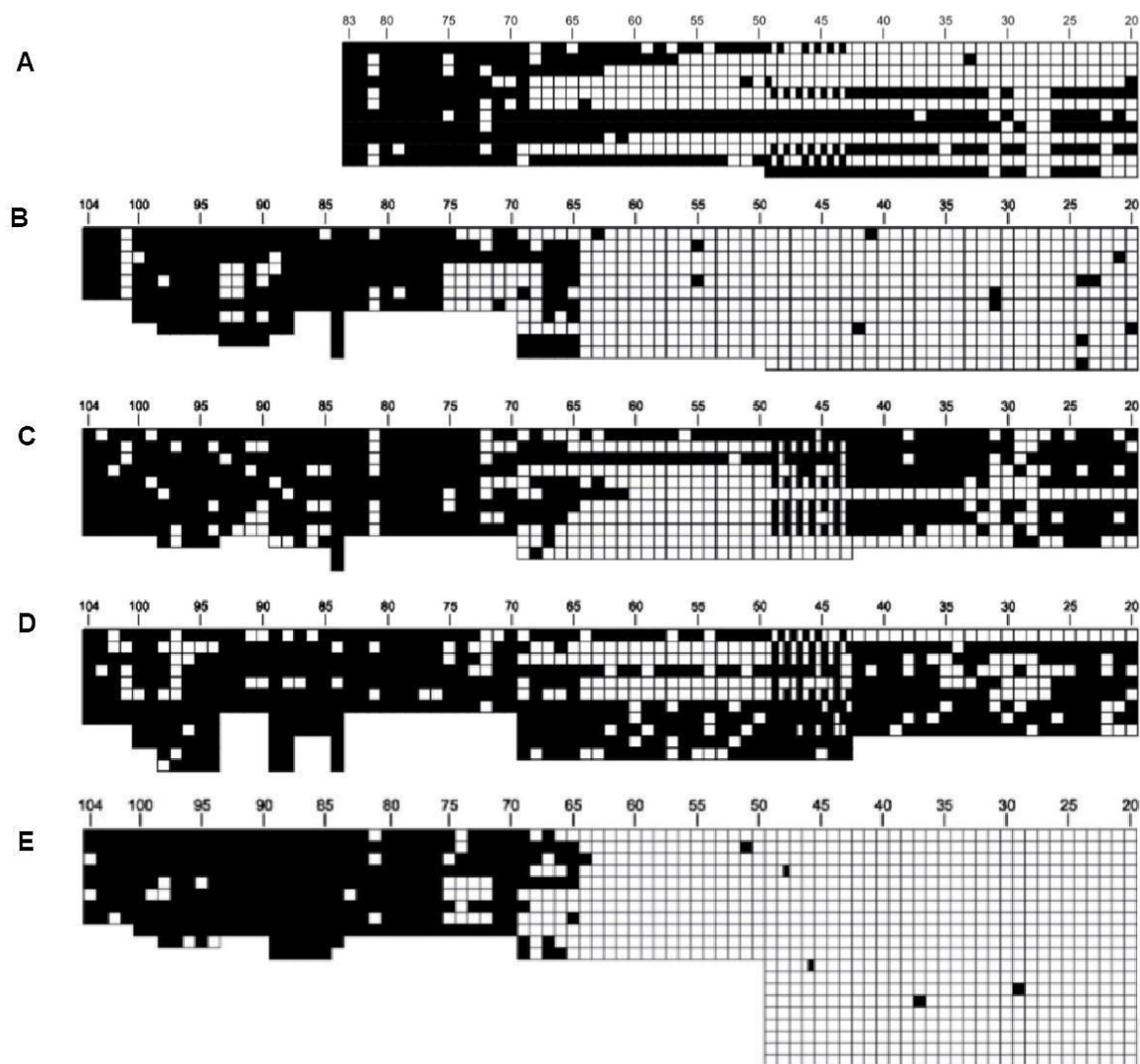
Fonte: Adaptada de Naumann *et al.*, 2009; 2014.



Em amostras de mulheres saudáveis, a borda de metilação estava aparente na CpG 69 ou 70 em metade das moléculas de DNA (Figura 6) (Naumann *et al.*, 2009). Na região entre os pares CpG 20 e 68, alguns cromossomos X analisados estavam metilados, enquanto outros permaneceram não metilados, com uma razão próxima a 1:1 (Naumann *et al.*, 2009). Esse padrão de mosaicismos provavelmente reflete a diferença nos níveis de metilação nos dois cromossomos X femininos, sendo um altamente metilado e outro não metilado ou hipometilado, em função da compensação de dose atrelada à inativação de um dos cromossomos X (Naumann *et al.*, 2009).

Os achados de Naumann e colaboradores (2014) ainda revelaram que a borda se encontra estável em genomas com risco de expansão das repetições CGG, tanto em homens quanto em mulheres portadores da pré-mutação (Figura 6). A metilação em cromossomos pré-mutados femininos exibe um perfil composto pelos dois padrões alélicos (Naumann *et al.*, 2014). Em mulheres portadoras da mutação completa, a região está 59% metilada e a borda ainda encontra-se vagamente discernível, enquanto que em portadoras da pré-mutação, a metilação das CpGs à jusante da borda tem uma média de 34,5% de metilação (Naumann *et al.*, 2014). Sendo assim, mulheres portadoras da pré-mutação exibem um perfil de metilação semelhante ao padrão observado em mulheres saudáveis (Naumann *et al.*, 2014). Já o perfil de metilação em pacientes com síndrome de Turner (45,X) revela uma borda de metilação de DNA distinta na localização esperada e uma região promotora do gene *FMR1* não metilada, como observado em homens saudáveis (Naumann *et al.*, 2014).

Figura 6 – Perfis de metilação na região promotora do gene *FMR1* e no segmento 5' à montante em linhagens celulares de mulheres saudáveis, homens e mulheres pré-mutados, mulheres com a mutação completa e pacientes com a síndrome de Turner (45,X)



Legenda: Em amostras com risco de expansão das repetições de trinucleotídeos CGG, a borda de metilação na região 5' UTR do gene *FMR1* parece permanecer intacta. Amostras analisadas por sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio, derivadas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de (a) mulher saudável, mostrando um mosaïcismo de metilação entre a CpG 20 e a 70; (b) homem e (c) mulher pré-mutados, mostrando que, entre as CpGs 20 e 65, 45% das CpGs estão metiladas no genoma feminino; (d) e mulher com mutação completa com 59% das CpGs metiladas. (e) Já o perfil de metilação observado em PBMCs de pacientes com síndrome de Turner (45,X) revela uma borda de metilação de DNA estável. Os números 20-104 designam os dinucleotídeos CpG na região: ■ metilados e □ não metilados.

Fonte: Adaptada de Naumann *et al.*, 2009; 2014.

Segundo Naumann e colaboradores (2009), a borda de metilação está presente em todos os tipos e linhagens celulares humanas, independentemente da idade, do gênero e do estágio de desenvolvimento. Essa sequência de borda, tanto quando as CpGs se encontram metiladas quanto não metiladas, se liga especificamente a proteínas nucleares de células humanas (Naumann *et al.*, 2009). Sendo assim, os autores interpretam essa borda como relacionada a uma estrutura de cromatina específica que distingue uma área hipermetilada no genoma de uma região promotora do *FMR1* não metilado e, com isso, protege o gene da disseminação da metilação (Naumann *et al.*, 2009). Esse achado sugere então mudanças na sequência de nucleotídeos e na estrutura da cromatina nesta região de borda em indivíduos com SXF (Naumann *et al.*, 2009).

A estabilidade da borda de metilação pode, portanto, ser crucial para proteger a região promotora do gene *FMR1* contra a metilação (Naumann *et al.*, 2009). Por se tratar de uma condição epigenética e teoricamente reversível (Bar-Nur *et al.*, 2012; Torrioli *et al.*, 2010), a elucidação de perfis de metilação em pacientes com a SXF pode abrir oportunidades de intervenção terapêutica. Isso é corroborado pela existência dos homens com expansões CGG acima de 200 sem metilação sem comprometimento intelectual (*HFMs*) (Tabolacci *et al.*, 2016). Contudo, a região de borda foi pouco explorada e o seu significado ainda é desconhecido, requerendo maiores investigações.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS-CIOABA MA, GUO Y, BIAN CB, *et al.* Structural studies of the tandem Tudor domains of fragile X mental retardation related proteins FXR1 and FXR2. *PLoS ONE* 2010; 5: e13559.
- ALISCH RS, BARWICK BG, CHOPRA P, *et al.* Age-associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome Res* 2012; 22(4): 623-632.
- ALISCH RS, WANG T, CHOPRA P, *et al.* Genome-wide analysis validates aberrant methylation in fragile X syndrome is specific to the FMR1 locus. *BMC Med Genet* 2013; 14: 18.
- ALLEN EG, SHERMAN S, ABRAMOWITZ A, *et al.* Examination of the effect of the polymorphic CGG repeat in the FMR1 gene on cognitive performance. *Behav Genet* 2005; 35(4): 435–445.
- ALVAREZ-MORA MI, GUITART M, RODRIGUEZ-REVENGA L, *et al.* Paternal transmission of a FMR1 full mutation allele. *Am J Med Genet A* 2017; 173(10): 2795–2797.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. American Psychiatric Association, 2017. [www.psychiatry.org](http://www.psychiatry.org). Acessado em 17/10/2021.
- ANASTASIADI D, ESTEVE-CODINA A, PIFERRER F. Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species. *Epigenetics Chromatin* 2018; 11(1): 37.
- ANTAR LN, BASSELL GJ. Sunrise at the Synapse: The FMRP mRNP Shaping the Synaptic Interface. *Neuron* 2003; 37(4): 555–558.
- ANTAR LN, DICTENBERG JB, PLOCINIAK M, *et al.* Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* 2005; 4(6): 350–359.
- ARAÚJO, FM. Estabelecimento de uma nova ferramenta molecular para investigação de expansões no gene *FMR1*. 2018. 63 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- ARMATAS V. Mental retardation: definitions, etiology, epidemiology and diagnosis. *J Sport Health Res* 2009; 1: 112-122.
- AROCENA DG, DE DIEGO Y, OOSTRA BA, *et al.* A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet* 2000; 106(3): 366–369.
- BAGNI C, GREENOUGH WT. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(5): 376–387.

- BAGNI C, TASSONE F, NERI G, *et al.* Science in medicine Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4314-4322.
- BAILEY DB, RASPA M, HOLIDAY D, *et al.* The functional skills of individuals with fragile X syndrome: A lifespan, cross-sectional analysis. *Am J Intellect Dev Disabil* 2009; 114: 289-303.
- BALL MP, LI JB, GAO Y, *et al.* Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 361–368.
- BAR-NUR O, CASPI I, BENVENISTY N, *et al.* Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J Mol Biol* 2012; 4: 180-183.
- BASSANI S, ZAPATA J, GEROSA L, *et al.* The neurobiology of X-linked intellectual disability. *Neuroscientist* 2013; 19(5): 541-552.
- BERRY-KRAVIS E, RASPA M, LOGGIN-HESTER L, *et al.* Seizures in fragile X syndrome: characteristics and comorbid diagnoses. *Am J Intellect Dev Disabil* 2010; 115: 461–472.
- BHOGAL B, JEPSON JE, SAVVA YA, *et al.* Modulation of dADAR-dependent RNA editing by the Drosophila fragile X mental retardation protein. *Nat Neurosci* 2011; 14(12): 1517–1524.
- BINDER G, RAPPOLD GA. SHOX Deficiency Disorders. 2005 [Updated 2018 Jun 28]. In: ADAM MP, ARDINGER HH, PAGON RA, *et al.* GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.
- BLACKWELL E, ZHANG X, CEMAN S. Arginines of the RGG box regulate FMRP association with polyribosomes and mRNA. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1314-1323.
- BOGDANOVIĆ O, SMITS AH, DE LA CALLE MUSTIENES E, *et al.* Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet* 2016; 48: 417–426.
- BODEGA B, BIONE S, DALPRA L, *et al.* Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Repro* 2006; 21(4): 952–957.
- BONARRIGO FA, RUSSO S, VIZZIELLO P, *et al.* Think about it: FMR1 gene mosaicism. *J Child Neurol* 2014; 29(9): NP74–NP77.
- BRENET F, MOH M, FUNK P, *et al.* DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS ONE* 2011; 6: e14524.

BRIGHTWELL G, WYCHERLEY R, POTTS G, *et al.* A highdensity SNP map for the FRAX region of the X chromosome. *J Hum Genet* 2002; 47: 567–575.

BROWN V, JIN P, CEMAN S, *et al.* Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 2001; 107(4): 477–487.

CASTEL AL, NAKAMORI M, TOMÈ S, *et al.* Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet* 2010; 20: 1–15.

CAUDY AA, MYERS M, HANNON GJ, *et al.* Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 2002; 16(19): 2491–2496.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Facts About Intellectual Disability, 2019. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Acessado em 30/07/2020.

CHELLY J, KHELFAOUI M, FRANCIS F, *et al.* Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 701-713.

CHEN L, YUN SW, SETO J, *et al.* The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience* 2003; 120(4): 1005–1017.

CHIURAZZI P, SCHWARTZ CE, GECZ J, *et al.* XLMR genes: update 2007. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 422-434.

CHIURAZZI P, KOZAK L, NERI G. Unstable triplets and their mutational mechanism: size reduction of the CGG repeat vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1994; 51(4): 517–521.

CHIURAZZI P, PIROZZI F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* 2016; 5(0): 599.

CHIURAZZI P, POMPONI MG, WILLEMSSEN R, *et al.* In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 109-113.

CIACCIO C, FONTANA L, MILANI D, *et al.* Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital J Pediatr* 2017; 43(1): 39.

CLEARY JD, PEARSON CE. Replication fork dynamics and dynamic mutations: the fork-shift model of repeat instability. *Trends Genet* 2005; 21: 272-280.

COFFEE B, ZHANG F, CEMAN S, *et al.* Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 923–932.

COFFEE B, IKEDA M, BUDIMIROVIC DB, *et al.* Mosaic FMR1 deletion causes fragile X syndrome and can lead to molecular misdiagnosis. *Am J Med Genet A* 2008; 146A(10): 1358-1367.

COFFEE B, ZHANG F, WARREN ST, *et al.* Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X syndrome cells. *Nat Genet* 1999; 22: 98-101.

COLAK D, ZANINOVIC N, COHEN MS, *et al.* Promoter-bound trinucleotide repeat mRNA drives epigenetic silencing in fragile X syndrome. *Science* 2014; 343: 1002–1005.

CORDEIRO L, BALLINGER E, HAGERMAN R, *et al.* Clinical assessment of DSM-IV anxiety disorders in fragile X syndrome: prevalence and characterization. *J Neurodev Disord* 2011; 3: 57–67.

CRAWFORD DC, ACUÑA JM, SHERMAN SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 2001; 3: 359-371.

DARNELL JC, VAN DRIESCHE SJ, ZHANG C, *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 2011; 146(2): 247–261.

DATTA S, ALAM MP, MAJUMDAR SS, *et al.* Nucleosomal occupancy and CGG repeat expansion: a comparative analysis of triplet repeat region from mouse and human fragile X mental retardation gene 1. *Chromosome Res* 2011; 19: 445–455.

DE GRAAFF E, DE VRIES BB, WILLEMSSEN R, *et al.* The fragile X phenotype in a mosaic male with a deletion showing expression of the FMR1 protein in 28% of the cells. *Am J Med Genet* 1996; 64(2): 302–308.

DE RUBEIS S, FERNANDEZ E, BUZZI A, *et al.* Molecular and Cellular Aspects of Mental Retardation in the Fragile X Syndrome: From Gene Mutation/s to Spine Dymorphogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2012; 970: 517–551.

DI RUSCIO A, EBRALIDZE AK, BENOUKRAF T, *et al.* DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature* 2013; 503: 371–376.

DJEBALI S, DAVIS CA, MERKEL A, *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012; 489: 101–108.

DUNN OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 1964; 6(3): 241–252.

EDAMURA KN, PEARSON CE. DNA methylation and replication: implications for the “deletion hotspot” region of FMR1. *Hum Genet* 2005; 118(2): 301–304.

EICHLER EE, RICHARDS S, GIBBS RA, *et al.* Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 1147-1153. Nota: Erratum: *Hum Molec Genet* 1994; 3: 684-685.

EICHLER EE, HOLDEN JA, POPOVICH BW, *et al.* Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 1994; 8: 88–94.

EPSZTEJN-LITMAN S, EIGES R. Monitoring for Epigenetic Modifications at the FMR1 Locus. *Methods Mol Biol* 2019; 1942: 29-48.

ERBS E, FENGER-GRON J, JACOBSEN CM, *et al.* Spontaneous rescue of a FMR1 repeat expansion and review of deletions in the FMR1 non-coding region. *Eur J Med Genet* 2021; 64: 104244.

FAN H, BOOKER JK, MCCANDLESS SE, *et al.* Mosaicism for an FMR1 gene deletion in a fragile X female. *Am J Med Genet A* 2005; 136: 214–217.

FERNÁNDEZ E, GENNARO E, PIROZZI F, *et al.* FXS-Like Phenotype in Two Unrelated Patients Carrying a Methylated Premutation of the *FMR1* Gene. *Front Genet* 2018; 9: 442.

FERNANDEZ-CARVAJAL I, LOPEZ POSADAS B, PAN R, *et al.* Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn* 2009; 11(4): 306-310.

FERREIRA SI, PIRES LM, FERRAO J, *et al.* Mosaicism for FMR1 gene full mutation and intermediate allele in a female foetus: A postzygotic retraction event. *Gene* 2013; 527: 421–425.

FLORIANI MA, VILAS BOAS MR, ROSA RFM, *et al.* Report of a patient with fragile X syndrome unexpectedly identified by karyotype analysis. *J Bras Patol Med Lab* 2017; 53(2): 108-109.

FU YH, KUHL DP, PIZZUTI A, *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67(6): 1047-1058.

GÉCZ J, SHOUBRIDGE C, CORBETT M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. *Trends Genet* 2009; 25: 308-316.

GENC B, MULLER-HARTMANN H, ZESCHNIGK M, *et al.* Methylation mosaicism of 5'-(CGG)(n)-3' repeats in fragile X, premutation and normal individuals. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(10): 2141– 2152.

GODLER DE, SLATER HR, BUI QM, *et al.* FMR1 intron 1 methylation predicts FMRP expression in blood of female carriers of expanded FMR1 alleles. *J Mol Diagn* 2011;13: 528–536.

GODLER DE, SLATER HR, BUI QM, *et al.* Fragile X mental retardation 1 (FMR1) intron 1 methylation in blood predicts verbal cognitive impairment in female carriers of expanded FMR1 alleles: evidence from a pilot study. *Clin Chem* 2012; 58(3): 590-598.



GODLER DE, TASSONE F, LOESCH DZ, *et al.* Methylation of novel markers of fragile X alleles is inversely correlated with FMRP expression and FMR1 activation ratio. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1618–1632.

GONÇALVES TF, DOS SANTOS JM, GONÇALVES AP, *et al.* Finding FMR1 mosaicism in Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16: 501-507.

GRASSO M, FARAVELLI F, LO NIGRO C, *et al.* Mosaicism for the full mutation and a microdeletion involving the CGG repeat and flanking sequences in the FMR1 gene in eight fragile X patients. *Am J Med Genet* 1999; 85: 311–316.

GREENWOOD GENETIC CENTER. XLID Genetic Research, 2021.  
<https://www.ggc.org/xlid-genetic-research>. Acessado em 11/10/2021.

GRØNSKOV K, HJALGRIM H, BJERAGER MO, *et al.* Deletion of all CGG repeats plus flanking sequences in FMR1 does not abolish gene expression. *Am J Hum Genet* 1997; 61(4): 961–967.

GROSS AM, JAEGER PA, KREISBERG JF, *et al.* Methylome-wide Analysis of Chronic HIV Infection Reveals Five-Year Increase in Biological Age and Epigenetic Targeting of HLA. *Mol Cell* 2016;62(2):157-168.

GUNTER C, PARADEE W, CRAWFORD DC, *et al.* Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. *Hum Mol Genet* 1998; 7(12): 1935–1946.

HADDAD LA, MINGRONI-NETTO RC, VIANNA-MORGANTE MA, *et al.* A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. *Hum Genet* 1996; 197: 808-812.

HAGERMAN RJ, HAGERMAN PJ. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research. Baltimore: The Johns Hopkins Univ Press 2002; 3–109.

HAGERMAN RJ, BERRY-KRAVIS E, HAZLETT H, *et al.* Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17065.

HAGERMAN PJ, BERRY-KRAVIS E, KAUFMANN WE, *et al.* Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatr* 2009; 123: 378-390.

HAGERMAN PJ, HAGERMAN RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004; 10(1): 25-30.

HAGERMAN RJ, HULL CE, SAFANDA JF, *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; 51(4): 298-308.

HAGERMAN RJ, LEEHEY M, HEINRICHS W, *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001; 57(1): 127–130.

HAGERMAN RJ, PROTIC D, RAJARATNAM A, *et al.* Fragile X-Associated Neuropsychiatric Disorders (FXAND). *Front Psychiatry* 2018; 9: 564.

HALL DA, BERRY-KRAVIS E. Fragile X syndrome and fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Handb Clin Neurol* 2018; 147: 377-391.

HALL DA, NAG S, OUYANG B, *et al.* Fragile X Gray Zone Alleles Are Associated With Signs of Parkinsonism and Earlier Death. *Mov Disord* 2020; 35(8): 1448-1456.

HALL D, TASSONE F, KLEPITSKAYA O, *et al.* Fragile X associated tremor ataxia syndrome in FMR1 gray zone allele carriers. *Mov Disord* 2012; 27(2): 296–300.

HAN XD, POWELL B, PHALIN JL, *et al.* 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* 2006; 140(13): 1463–1471.

HANDT M, EPPLEN A, HOFFJAN S, *et al.* Point mutation frequency in the FMR1 gene as revealed by fragile X syndrome screening. *Mol Cell Probes* 2014; 28: 279–283.

HAYWARD BE, KUMARI D, USDIN K. Recent advances in assays for the Fragile X-related disorders. *Hum Genet* 2017; 136(10): 1313–1327.

HAYWARD B, LOUTAEV I, DING X, *et al.* Fragile X syndrome in a male with methylated premutation alleles and no detectable methylated full mutation alleles. *Am J Med Genet A* 2019;179(10): 2132-2137.

HAYWARD BE, USDIN K. Mechanisms of Genome Instability in the Fragile X-Related Disorders. *Genes (Basel)* 2021; 12(10): 1633.

HEALY A, RUSH R, OCAIN T. Fragile X syndrome: An update on developing treatment modalities. *ACS Chemical Neuroscience* 2011; 2(8): 402-410.

HELLMAN A, CHESS A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007; 315(5815): 1141–1143.

HERMANN A, GOYAL R, JELTSCH A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* 2004; 279: 48350–48359.

HIRST MC, GREWAL PK, DAVIES KE. Precursor arrays for triplet repeat expansion at the fragile X locus. *Hum Mol Genet* 1994; 3(9): 1553–1560.

HOCHSTEIN N, MUIZNIEKS I, MANGEL L, *et al.* Epigenetic status of an adenovirus type 12 transgenome upon long-term cultivation in hamster cells. *J Virol* 2007; 81: 5349–5361.

HOGAN AL, CARAVELLA KE, EZELL J, *et al.* Autism spectrum disorder symptoms in infants with fragile X syndrome: a prospective case series. *J Autism Dev Disord* 2017; 47: 1628–1644.

HUANG J, ZHU T, QU Y, *et al.* Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systemic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11(4): e0153655.

HUNTER JE, BERRY-KRAVIS E, HIPPI H, *et al.* FMR1 Disorders. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021 [updated 2019 Nov 21].

HUNTER J, RIVERO-ARIAS O, ANGELOV A, *et al.* Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2014; 164A(7): 1648–1658.

ILLINGWORTH RS, BIRD AP. CpG islands— ‘a rough guide’. *FEBS Lett* 2009; 583: 1713–1720.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde 2019. <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31445-pns-2019-pais-tem-17-3-milhoes-de-pessoas-com-algum-tipo-de-deficiencia>. Acessado em 17/10/2021

ISHIZUKA A, SIOMI MC, SIOMI H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* 2002; 16(19): 2497–2508.

JIRAANONT P, KUMAR M, TANG HT, *et al.* Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17(11): 1023–1032.

KAUFMAN L, AYUB M, VINCENT JB. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* 2010; 2 (4): 182-209.

KENNESON A, ZHANG F, HAGEDORN CH, *et al.* Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet* 2001; 10(14): 1449–1454.

KHALIL AM, FAGHIHI MA, MODARRESI F, *et al.* A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS ONE* 2008; 3: e1486.

KRAAN CM, GODLER DE, AMOR DJ. Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders. *Dev Med Child Neurol* 2019; 61(2): 121-127.

KRUSKAL WH, WALLIS WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 1952; 47(260): 583–621.

- KUMARI D, LOKANGA R, YUDKIN D, *et al.* Chromatin changes in the development of the fragile X-associated disorders and Friedreich ataxia. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819: 802–810.
- KUMARI D, USDIN K. The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2010; 19(23): 4634–4642.
- KUNST CB, WARREN ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994; 77(6): 853–861.
- KUNST CB, ZERYLNICK C, KARICKHOFF L, *et al.* FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet* 1996; 58(3): 513–522.
- KVARNUNG M, NORDGREN A. Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. In: Posada de la Paz M, Taruscio D, Groft S (eds) Rare Diseases Epidemiology: Update and Overview. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1031:39-54.
- LADD PD, SMITH LE, RABAIA NA, *et al.* An antisense transcript spanning the CGG individuals. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3174–3187.
- LANNI S, GORACCI M, BORRELLI L, *et al.* Role of CTCF Protein in Regulating FMR1 Locus Transcription. *PLoS Genet* 2013; 9(7): e1003601.
- LATHAM GJ, COPPINGER J, HADD AG, *et al.* The role of AGG interruptions in fragile X repeat expansions: A twenty-year perspective. *Front Genet* 2014; 5: 244.
- LEONARD H, WEN X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8: 117-134.
- LIU Y, WINARNI T, ZHANG L, *et al.* Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in grey zone carriers. *Clin Genet* 2013; 84(1): 74–77.
- LIU XS, WU H, KRZISCH M, *et al.* Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell* 2018;172(5): 979-992.
- LOWDON RF, JANG HS, WANG T. Evolution of epigenetic regulation in vertebrate genomes. *Trends Genet TIG* 2016; 32: 269–283.
- LUBS HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969; 21(3): 231-244.
- LUBS HA, STEVENSON RE, SCHWARTZ CE. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 579-590.
- LUDWIG AL, ESPINAL GM, PRETTO DI, *et al.* CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. *Hum Mol Genet* 2014; 23(12): 3228–3238.

LUO S, HUANG W, CHEN C, *et al.* An novel deletion to normal size in the sperm of a fragile X full mutation male. *Clin Genet* 2014; 86: 295–297.

LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature* 1961; 190: 372–373.

MAIA N, LOUREIRO JR, OLIVEIRA B, *et al.* Contraction of fully expanded FMR1 alleles to the normal range: predisposing haplotype or rare events? *J Hum Genet* 2017; 62: 269-275.

MALTER HE, IBER JC, WILLEMSSEN R, *et al.* Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat Genet* 1997; 15: 165-169.

MAN L, LEKOVICH J, ROSENWAKS Z, *et al.* Fragile X-Associated Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency from Molecular Mechanisms to Clinical Manifestations. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 290.

MANDEL JL, CHELLY J. Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(9): 689-693.

MANOR E, JABAREEN A, MAGAL N, *et al.* Prenatal Diagnosis of Fragile X: Can a Full Mutation Allele in the FMR1 Gene Contract to a Normal Size? *Front Genet* 2017; 8: 158.

MARRUS N, HALL L. Intellectual Disability and Language Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2017; 26(3): 539–554.

MARTIN JP, BELL J. A pedigree of mental defect showing sexlinkage. *J Neurol Psychiatry* 1943; 6(3-4): 154–157.

MAURER-STROH S, DICKENS NJ, HUGHES-DAVIES L, *et al.* The Tudor domain 'royal family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 69-74.

MERENSTEIN SA, SOBESKY WE, TAYLOR AK, *et al.* Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. *Am J Med Genet* 1996; 64: 388-394.

MILLAR DS, PAUL CL, MOLLOY PL, *et al.* A distinct sequence (ATAAA)<sub>n</sub> separates methylated and unmethylated domains at the 50-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem* 2000; 275: 24893–24899.

MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.

MONAGHAN KG, LYON E, SPECTOR EB, *et al.* ACMG standards and guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2013; 15: 575–586.

MOORE LD, LE T, FAN G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38: 23–38.

NATIONAL FRAGILE X SYNDROME. Fragile X 101, 2021. <https://fragilex.org/>. Acessado em 31/10/2021.

NAUMANN A, HOCHSTEIN N, WEBER S, *et al.* A distinct DNA methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 606–616.

NAUMANN A, KRAUS C, HOOGEVEEN A, *et al.* Stable DNA Methylation Boundaries and Expanded Trinucleotide Repeats: Role of DNA Insertions. *J Mol Biol* 2014; 426: 2554–2566.

NERI G, SCHWARTZ CE, LUBS HA, *et al.* X-linked intellectual disability update 2017. *Am J Med Genet A* 2018; 176 (6): 1375-1388.

NOBILE V, PUCCI C, CHIURAZZI P, *et al.* DNA Methylation, Mechanisms of FMR1 Inactivation and Therapeutic Perspectives for Fragile X Syndrome. *Biomolecules* 2021, 11(2): 296.

NOLIN SL, BROWN WT, GLICKSMAN A, *et al.* Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet* 2003; 72 (2): 454-464.

NOLIN SL, GLICKSMAN A, ERSALESI N, *et al.* Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med* 2015; 17(5): 358–364.

NOLIN SL, GLICKSMAN A, HOUCK GE Jr, *et al.* Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet* 1994; 51(4): 509–512.

NOLIN SL, GLICKSMAN A, TORTORA N, *et al.* Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A* 2019; 179(7):1148-1156.

NOLIN SL, SHA S, GLICKSMAN A, *et al.* Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. *Am J Med Genet A* 2013; 161: 771–788.

NOTO V, HARRITY C, WALSH D, *et al.* The impact of FMR1 gene mutations on human reproduction and development: a systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(9): 1135-1147.

OBERLÉ I, ROUSSEAU F, HEITZ D, *et al.* Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.

ORRICO A, GALLI L, DOTTI MT, *et al.* Mosaicism for full mutation and normal-sized allele of the FMR1 gene: a new case. *Am J Med Genet* 1998; 78(4): 341–344.

PANDELACHE A, BAKER EK, ALIAGA SM, *et al.* Clinical and Molecular Differences between 4-Year-Old Monozygous Male Twins Mosaic for Normal, Premutation and Fragile X Full Mutation Alleles. *Genes (Basel)* 2019; 10(4): 279.

PANDEY RR, MONDAL T, MOHAMMAD F, *et al.* Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell* 2008; 32: 232–346.

PARK CY, HALEVY T, LEE DR *et al.* Reversion of FMR1 methylation and silencing by editing the triplet repeats in fragile X iPSC-derived neurons. *Cell Rep* 2015; 13: 234–241.

PASTORI C, PESCHANSKY VJ, BARBOUTH D, *et al.* Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human FMR1 gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *Hum Genet* 2014; 133(1): 59-67.

PATEL DR, GREYDANUS DE, CALLES JL Jr, *et al.* Developmental disabilities across the lifespan. *Dis Mon* 2010; 56: 304-397.

PEPRAH E. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Genet* 2012; 76(2): 178–191.

PEPRAH E, HE W, ALLEN E, *et al.* Examination of FMR1 transcript and protein levels among 74 premutation carriers. *J Hum Genet* 2010; 55(1): 66–68.

PHILOFSKY A, HEPBURN SL, HAYES A, *et al.* Linguistic and cognitive functioning and autism symptoms in young children with Fragile X syndrome. *Am J Ment Retard* 2004; 109: 208-218.

PIETROBONO R, TABOLACCI E, ZALFA F, *et al.* Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 267–277

PIETROBONO R, POMPONI MG, TABOLACCI E, *et al.* Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3278–3285.

PRAWER Y, HUNTER M, CRONIN S, *et al.* Prenatal Diagnosis of Fragile X Syndrome in a Twin Pregnancy Complicated by a Complete Retraction. *Genes* 2018; 9: 287.

PRETTO D, YRIGOLLEN CM, TANG HT, *et al.* Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Front Genet* 2014; 5: 318.

PRETTO DI, HUNSAKER MR, CUNNINGHAM CL, *et al.* Intranuclear inclusions in a fragile X mosaic male. *Transl Neurodegener* 2013; 2: 10.

PRIMERANO B, TASSONE F, HAGERMAN RJ, *et al.* Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *RNA (New York, NY)* 2002; 8(12): 1482–1488.

RASKE C, HAGERMAN PJ. Molecular pathogenesis of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *J Investig Med* 2009; 57(8): 825–829.

REYNIERS E, VITS L, DE BOULLE K, *et al.* The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 1993; 4: 143–146.

RICCERI L, CATANIA MV, BARDONI B. Editorial: neural and behavioral biology of intellectual disability (ID). *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 46 Pt 2:159-160.

RINN JL, KERTESZ M, WANG JK, *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129: 1311–1323.

ROPERS HH. X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 260-269.

ROUSSEAU F, HEITZ D, BIANCALANA V, *et al.* Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673–1681.

SALDARRIAGA W, TASSONE F, GONZÁLEZ-TESHIMA LY, *et al.* Fragile X Syndrome. *Colomb Med* 2014; 45(4): 190-198.

SANTORO MR, BRAY SM, WARREN ST. Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annu Rev Pathol Mech* 2012; 7: 219-245.

SCHMUCKER B, SEIDEL J. Mosaicism for a full mutation and a normal size allele in two fragile X males. *Am J Med Genet* 1999; 84(3): 221–225.

SCHWEMMLE S, DE GRAAF E, DEISLER H, *et al.* Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1354–1362.

SCHNEIDER A, SERITAN A, TASSONE F, *et al.* Psychiatric features in high-functioning adult brothers with fragile X spectrum disorders. *Prim Care Companion CNS Disord* 2013; 15: 2.

SHERMAN SL. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97(3): 189-194.

SITZMANN AF, HAGELSTROM RT, TASSONE F, *et al.* Rare FMR1 gene mutations causing fragile X syndrome: A review. *Am J Med Genet A* 2018; 176(1): 11-18.



SNOW K, TESTER DJ, KRUCKEBERG KE, *et al.* Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: Implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum Mol Genet* 1994; 3(9): 1543–1551.

SPECTOR E, BEHLMANN A, KRONQUIST K, *et al.* Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2021; 23(5): 799–812.

STEVENSON RE, SCHWARTZ CE. X-linked intellectual disability: unique vulnerability of the male genome. *Dev Disabil Res Rev* 2009; 15(4): 361–368.

STEVENSON RE, SCHWARTZ CE, ROGERS RC. Atlas of X-Linked Intellectual Disability Syndromes. 2nd ed. *Estados Unidos da América: Oxford University Press*, 2012.

STRAUSSMAN R, NEJMAN D, ROBERTS D, *et al.* Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 564–571.

SULLIVAN K, HATTON D, HAMMER J, *et al.* ADHD symptoms in children with FXS. *Am J Med Genet A* 2006; 140A: 2275–2288.

TABOLACCI E, MANCANO G, LANNI S, *et al.* Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells. *Epigenetics Chromatin* 2016b; 9: 12.

TABOLACCI E, MOSCATO U, ZALFA F, *et al.* Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *Eur J Hum Genet* 2008a; 16: 1487–1498.

TABOLACCI E, PALUMBO F, NOBILE V, *et al.* Transcriptional reactivation of the FMR1 Gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes* 2016a; 7(8): 1–16.

TABOLACCI E, PIETROBONO R, MANERI G, *et al.* Reversion to Normal of FMR1 Expanded Alleles: A Rare Event in Two Independent Fragile X Syndrome Families. *Genes* 2020; 11: 248.

TABOLACCI E, PIETROBONO R, MOSCATO U, *et al.* Differential epigenetic modifications in the FMR1 gene of the fragile X syndrome after reactivating pharmacological treatments. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 641–648.

TABOLACCI E, POMPONI MG, PIETROBONO R, *et al.* A unique case of reversion to normal size of a maternal premutation FMR1 allele in a normal boy. *Eur J Hum Genet* 2008b; 16(2): 209–214.

TASSONE F, HAGERMAN RJ, LOESCH DZ, *et al.* Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet* 2000; 94(3): 232–236.

TODOROV T, TODOROVA A, KIROV A, *et al.* Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. *BMJ Case Rep* 2009; 2009: bcr.06.2008.0139.

TORRIOLI M, VERNACOTOLA S, SETINI C, *et al.* Treatment with valproic acid ameliorates ADHD symptoms in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet A* 2010; 152A: 1420-1427.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. FMR1 Gene, 2020.  
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/FMR1#location>. Acessado em 04/04/2020.

USDIN K, HAYWARD BE, KUMARI D, *et al.* Repeat-mediated genetic and epigenetic changes at the FMR1 locus in the Fragile X-related disorders. *Front Genet* 2014; 5: 226.

USDIN K, KUMARI D. Repeat-mediated epigenetic dysregulation of the FMR1 gene in the fragile X-related disorders. *Front Genet* 2015; 6: 192.

VERKERK AJ, PIERETTI M, SUTCLIFFE JS, *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: 905-914.

VILLATE O, IBARLUZEA N, MAORTUA H, *et al.* Effect of AGG Interruptions on FMR1 Maternal Transmissions. *Front Mol Biosci* 2020; 7: 135.

WANG T, BRAY SM, WARREN ST. New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(3): 256-263.

WANG X, SONG X, GLASS CK, *et al.* The long arm of long noncoding RNAs: Roles as sensors regulating gene transcriptional programs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a003756.

WILLEMS PJ, VAN ROY B, DE BOULLE K, *et al.* Segregation of the fragile X mutation from an affected male to his normal daughter. *Hum Mol Genet* 1992; 1(7): 511-515.

WILLEMSSEN R, BONTEKOE CJ, SEVERIJNEN LA, *et al.* Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum Genet* 2002; 110(6): 601-605.

XIE N, GONG H, SUHL JA, *et al.* Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-mediated deletion of the expanded CGG-repeat of the fragile X chromosome. *PLoS One* 2016; 11(10): e0165499.

YANG W, YAN A, XU Y, *et al.* Further identification of a 140bp sequence from amid intron 9 of human FMR1 gene as a new exon. *BMC Genet* 2020; 21: 63.

YRIGOLLEN CM, DURBIN-JOHNSON B, GANE L, *et al.* AGG interruptions within the maternal FMR1 gene reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med* 2012; 14(8): 729-736.

ZEESMAN S, ZWAIGENBAUM L, WHELAN DT, *et al.* Paternal transmission of fragile X syndrome. *Am J Med Genet A* 2004; 129A(2): 184–189.

ZHAO XN, USDIN K. UPS and downs: mechanisms of repeat instability in the fragile X-related disorders. *Genes (Basel)* 2016; 7(9):1–14.

ZHOU Y, HU Y, SUN Q, *et al.* Non-coding RNA in Fragile X Syndrome and Converging Mechanisms Shared by Related Disorders. *Front Genet* 2019;10:139.