

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (BULBO
DE CABELO) PARA PORTADORES DA SÍNDROME DO X FRÁGIL.
COMPARAÇÃO COM AS TÉCNICAS CITOGENÉTICA E
MOLECULAR (PCR)**

Lílian Barros Queiroz

**Brasília
2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (BULBO
DE CABELO) PARA PORTADORES DA SÍNDROME DO X FRÁGIL.
COMPARAÇÃO COM AS TÉCNICAS CITOGENÉTICA E
MOLECULAR (PCR)**

Lílian Barros Queiroz

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.**

Orientadora: Prof^ª Dra. Íris Ferrari

Co-Orientador: Prof Dr. Riccardo Pratesi

**Brasília
2007**

Queiroz, Lílian Barros

Avaliação da Técnica de Imuno-histoquímica (Bulbo de Cabelo) para Portadores da Síndrome do X Frágil. Comparação com as Técnicas Citogenética e Molecular (PCR) / Lílian Barros Queiroz. Brasília, 2007.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília/UnB.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Íris Ferrari / Co-Orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi

I. Ferrari, Íris; II. Pratesi, Riccardo; III. Título; IV. Síndrome do X Frágil (SXF); V. FRAXA; VI. Imuno-histoquímica; VII. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, que sempre me acompanhou com amor e imensa dedicação durante toda esta caminhada.

Aos meus irmãos, Renard e Luciano, pelo carinho e esforço de tornar real um sonho buscado.

As minhas queridas tias, meu namorado e a todos da minha família pelo incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo, pelas oportunidades e pela vida.

À querida professora e orientadora **Dra. Íris Ferrari**, a quem devo esta conquista, fruto de seus valiosos ensinamentos, paciência, apoio incondicional, exemplo de competência e dedicação profissional que me nortearam na busca e alcance do meu objetivo. Expresso aqui minha gratidão pela valiosa colaboração nas diversas etapas deste trabalho, pela disponibilidade em analisar as amostras, mesmo aos domingos, e a acolhida tão carinhosa em seu laboratório de genética onde comecei o meu primeiro estágio.

Ao professor e co-orientador **Dr. Riccardo Pratesi**, pela grande colaboração na efetivação deste trabalho, pelos conselhos e encorajamento nos momentos em que não me achava capaz, e ainda pela compreensão, disponibilidade e amizade demonstrada.

À **Dra. Mara Santos** e ao **Dr. José Carlos Córdoba** pela amizade e confiança depositada. Agradeço por ter colocado à minha disposição os recursos do Laboratório do Hospital de Apoio e pela importante contribuição na minha formação profissional. Em especial à você Dra. Mara pela importante colaboração na análise citogenética.

À Professora **Dra. Anamélia Bocca**, pela competência na padronização da técnica de imuno-histoquímica, pelo fornecimento de vários reagentes necessários ao estudo, pela imensa paciência e colaboração ao me facilitar o uso do seu laboratório.

Ao **Reinaldo e Rizael**, pelos ensinamentos e grandiosa ajuda no protocolo do exame molecular (PCR), sem o apoio de vocês não conseguiria realizar esta técnica. Agradeço por possibilitar este diagnóstico aos pacientes e por terem me possibilitado uma visita técnica à Rede Sarah para aprimoramento dos resultados da pesquisa.

Ao professor **Pedro Tauil**, pelas sugestões na análise estatística.

Ao professor **Estevam**, por contagiar a todos com sua alegria.

Ao Dr. **Alliot**, pela serenidade transmitida e sugestões que enriqueceram meu trabalho.

Aos meus queridos pais, **José Maria** e **Lucinha**, por todo apoio, carinho e amor. Em especial, à minha querida mãe, pela admiração e companheirismo.

Às minhas queridas e saudosas **Vó** e **tia Aninha**, pelo imenso amor dedicado e exemplos de vida deixados.

À toda minha amada **família, tios e primos**, que contribuíram com pensamentos e atitudes positivas que me encorajaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial à você **Carol**, minha afilhada de coração, pelos momentos divertidos e únicos.

À querida **tia Lourdinha**, minha amiga confidente que me compreende e ilumina. Agradeço a dedicação e imenso amor, a presença constante e marcante em todos os momentos de minha vida, inclusive na coleta de materiais deste trabalho.

Ao meu namorado **Giácomo**, por todos os momentos que passamos juntos e que me fizeram crescer em todos os sentidos.

Às amigas **Ana Beatriz** pela amizade e carinho, e **Alessandra Baptista** pelos ensinamentos em biologia molecular, paciência, longas conversas, amizade e pela ótima parceira de trabalho com a Bia, que saudade!... À **Débora Rabello**, pela enorme admiração, motivação, exemplo de garra e coragem. À **Thenille do Carmo**, minha protetora e mentora, pela amizade e carinho nesses anos.

Aos amigos do laboratório de Genética Clínica: **Dra. Beatriz Versiani** pela amizade e convívio prazeroso, pela presteza em corrigir os resultados liberados aos pacientes; **Nilza de Jesus**, pela amiga sempre disposta a servir, pela colaboração e arte em bandamento G nos casos de X frágil; **Áurea**, pelas conversas e sugestões; **Côrtes**, pela paciência em procurar e preparar soluções; **Frâncio**, pela amizade e presteza, sempre me ajudando nas fichas de atendimento.

Aos pós-graduandos e amigos **Débora Rabello, Rodrigo Coutinho, Rita Cássia, Priscilla, Ingrid e Viviane**, pelo tempo em que estivemos juntos compartilhando de um mesmo ideal. Meu carinho e saudade.

Aos amigos **Leili, Tércio, Maristela, Renata e Ingrid**, pelos raros encontros, porém muito saudáveis e alegres.

Aos colegas da Farmacologia Molecular **Rilva, Gustavo e Cristina**.

Aos Colegas do Laboratório de Patologia: **Viviane, Yanna, Rosane, Janaína e Eliza**.

À equipe de Genética Clínica do HUB (**Dra. Íris Ferrari, Dra. Mara Santos, Dra. Beatriz Versiani e Dra. Heloísa**) por me permitir a realização deste trabalho em seus pacientes, de fundamental apoio e colaboração.

Às pessoas que permitiram a retirada de bulbos de cabelo, como contribuição ao meu grupo controle, especialmente, **Vinícius e Frâncio**, que sofreram no início da técnica.

Aos **Pacientes** e seus **Familiares**, por terem buscado o diagnóstico no Ambulatório de Genética Clínica - HUB, o que possibilitou este estudo. Às famílias, que gentilmente consentiram o uso de preciosas fotografias para ilustração deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE GRÁFICOS | xii |
| LISTA DE QUADROS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiii |
| Resumo | xv |
| Abstract..... | xviii |
| 1. Revisão Bibliográfica | 1 |
| 1.1 Histórico | 2 |
| 2. Introdução | 8 |
| 2.1 Definição | 9 |
| 2.2 Características fenotípicas e comportamentais | 10 |
| 2.3 Patogênese | 19 |
| 2.3.1 Gene <i>FMRI</i> | 19 |
| 2.3.2 Mutação no cromossomo X..... | 19 |
| 2.3.3 Mosaicismo | 23 |
| 2.3.4 Proteína FMRP | 23 |
| 2.3.5 Transmissão da expansão CGG..... | 25 |
| 3. Diagnóstico..... | 29 |
| 3.1 Citogenética - Expressão do sítio frágil no cromossomo X | 30 |
| 3.2 Imuno-histoquímica | 33 |
| 3.3 Método molecular de investigação - reação em cadeia da polimerase (PCR) | 34 |
| 4. Objetivo..... | 37 |
| 5. Pacientes e Métodos | 39 |
| 5.1 Casuística | 40 |
| 5.2 Aconselhamento genético..... | 41 |
| 5.3 Metodologia | 41 |
| 5.4 Técnicas realizadas..... | 43 |
| 5.4.1 Citogenética..... | 43 |
| 5.4.2 Imuno-histoquímica | 47 |
| 5.4.3 Molecular (PCR) | 50 |
| 5.5 Cálculo das propriedades estáveis..... | 58 |

| | |
|---|------------|
| 6. Resultados | 59 |
| 6.1 Resultados da Citogenética | 61 |
| 6.2 A prevalência de polimorfismos entre os pacientes suspeitos da SXF | 63 |
| 6.3 Resultados da Imuno-histoquímica | 63 |
| 6.4 Resultados da PCR | 65 |
| 6.5 Comparação entre os resultados das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em pacientes suspeitos da SXF | 66 |
| 6.6 Comparação entre os resultados das técnicas de citogenética e PCR em pacientes suspeitos da SXF | 67 |
| 6.7 Comparação entre as técnicas de citogenética, imuno-histoquímica e PCR em pacientes do sexo feminino suspeitos da SXF | 68 |
| 6.8 Propriedades estáveis da imuno-histoquímica | 69 |
| 6.9 Propriedades estáveis da citogenética | 70 |
| 7. Discussão | 72 |
| 8. Conclusões | 90 |
| 9. Referências | 92 |
| 10. Anexos | 110 |
| ANEXO I – Soluções utilizadas nos protocolos | 111 |
| ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos UnB | 118 |
| ANEXO III – Autorização envolvendo pacientes do HUB | 119 |
| ANEXO IV – Termo de consentimento livre e esclarecido | 120 |
| ANEXO V – Autorização para uso de imagem | 121 |
| ANEXO VI – Tabela dos resultados de imuno-histoquímica de indivíduos controles | 122 |
| ANEXO VII – Tabela dos resultados de imuno-histoquímica, molecular e citogenética | 125 |
| ANEXO VIII – Quantificação dos DNA's | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Par de cromossomo X com a seta indicando o sítio frágil X na região Xq27.3..... | 10 |
| Figura 2 - Dismorfias faciais em indivíduos afetados pela SXF..... | 11 |
| Figura 3 – Ilustra o exon 1 do gene <i>FMRI</i> no estado normal, pré-mutado e mutado metilado..... | 21 |
| Figura 4 - Pareamento das bases púricas e pirimidínicas do DNA..... | 35 |
| Figura 5 - Ciclos da PCR e suas etapas de desnaturação, pareamento e extensão..... | 36 |
| Figura 6 - Esquema da interação antígeno-anticorpo..... | 48 |
| Figura 7 - Preparo dos tubos da PCR mostrando as soluções utilizadas..... | 53 |
| Figura 8 - Visualização do sítio frágil numa metáfase obtida de cultura de linfócitos..... | 62 |
| Figura 9 - Expressão da proteína FMRP em bulbo de cabelo por meio da técnica de fosfatase alcalina indireta..... | 64 |
| Figura 10 - Gel de agarose a 2,5%, contendo produtos da PCR..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Lista de características físicas, comportamentais e anamnéticas freqüentemente encontradas em pacientes com X frágil..... | 13 |
| Tabela 2 – Freqüências absoluta e relativa da população estudada segundo o sexo..... | 60 |
| Tabela 3 – Distribuição da população estudada segundo o sexo e os exames realizados..... | 60 |
| Tabela 4 – Resultados da citogenética segundo o sexo..... | 61 |
| Tabela 5 – Portadores da SXF com a menor e maior percentagem de células que expressaram o sítio frágil, juntamente com a freqüência de <10% ou ≥10% que ocorreram nos indivíduos afetados..... | 62 |
| Tabela 6 – Resultados da imuno-histoquímica segundo o sexo, Brasília, 2006-2007..... | 64 |
| Tabela 7 – Resultados da PCR segundo o sexo, Brasília, 2006-2007..... | 65 |
| Tabela 8 – Resultados das análises de imuno-histoquímica e PCR de pacientes do sexo masculino suspeitos da SXF. | 70 |
| Tabela 9 – Resultados das análises citogenética e PCR de pacientes do sexo masculino suspeitos da SXF..... | 71 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 – Comparação entre os resultados das técnicas de imuno-histoquímica e PCR, em indivíduos do sexo masculino suspeitos da SXF. | 67 |
| Gráfico 2 – Comparação entre a frequência relativa dos resultados da citogenética e PCR em homens suspeitos da SXF..... | 68 |
| Gráfico 3 – Comparação entre a frequência absoluta dos resultados obtidos pelas técnicas de citogenética, imuno-histoquímica e PCR em mulheres suspeitas da SXF..... | 69 |
| Gráfico 4 – Valores referentes às propriedades estáveis obtidos pela comparação das técnicas de imuno-histoquímica/PCR e citogenética/ PCR em homens suspeitos da SXF..... | 71 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Nucleotídeos (dNTP's) e suas respectivas concentrações e volume. | 52 |
| Quadro 2 - Reação MIX utilizada no preparo da PCR..... | 53 |
| Quadro 3 – Programa dos ciclos da PCR..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ng | Nanograma |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µmol | Micromoles |
| BSA | Albumina bovina sérica |
| DNA: | Ácido desoxiribonucleico |
| dNTP | Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| <i>FMR1</i> : | Fragile X Mental Retardation 1 |
| FMRP: | Fragile X Mental Retardation Protein |
| FRAXA: | Sítio frágil localizado na região Xq27.3 do cromossomo X |
| FRAXE: | Sítio frágil localizado na região Xq28 do cromossomo X |
| FXTAS | Síndrome ataxia/tremor associada ao cromossomo X frágil (Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome) |
| g | grama |
| IC: | Intervalo de confiança |
| kb: | 1 x 10 ³ pares de base |
| M | molar |

| | |
|------|--|
| mA | Miliamperes |
| mg | Miligrama |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| Min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mRNA | RNA mensageiro |
| °C | Graus Celsius |
| Pb: | Pares de bases |
| PCR: | Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pmol | picomoles |
| mM | Milimoles |
| RM: | Retardo mental |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| rpm | rotações por minuto |
| SB: | Southern blot |
| SDS | Sódio dodecil sulfato |
| SXF: | Síndrome do X frágil |
| Tris | Tri(hidroximetil) aminometano |
| U | Unidade enzimática |

Resumo

A síndrome do X frágil (SXF), causa comum de retardo mental (RM) hereditário ocorre por mutação no gene *FMR1* pela expansão não traduzida de CGG na extremidade 5'. Na população, a expansão varia de 5 a 52 repetições. Portadores de 52 a 200 cópias (pré-mutação) produzem a proteína FMRP, porém podem transmitir a mutação à geração seguinte. Indivíduos SXF possuem mais de 200 cópias (mutação completa) e resulta em metilação e inativação do gene impedindo a expressão da FMRP. Ausência de FMRP é responsável pelo RM. Mulheres portadoras da mutação completa apresentam variação no grau de RM devido inativação aleatória do X. A SXF é identificada pelo sítio frágil (FRAXA), na região Xq27.3. A imuno-histoquímica permite observar a expressão da FMRP no bulbo de cabelo. Indivíduos afetados mostram níveis inferiores aos controles. A reação em cadeia da polimerase (PCR) representa o melhor método para triagem da SXF. **Objetivos:** 1) avaliar a eficácia da técnica de imuno-histoquímica em pacientes suspeitos de SXF; 2) comparar três técnicas de diagnóstico para SXF: imuno-histoquímica, citogenética e PCR. **Métodos:** foram selecionados 121 pacientes com suspeita SXF sendo 59 (48,8%) homens e 62 (51,2%) mulheres. Noventa indivíduos sadios, com 75-100% de expressão da FMRP foram selecionados como controles negativos da imuno-histoquímica. **Resultados:** de 113 pacientes que realizaram a imuno-histoquímica, 54 eram homens, com 17 positivos, 28 negativos e nove inconclusivos e 59 mulheres, com sete positivas, 27 negativas e 25 inconclusivas. Entre os 119 que realizaram a PCR, 57 homens, com 20 positivos e 37 negativos e 62 mulheres, com três negativas e 59 inconclusivas. Dos 104 pacientes analisados para citogenética, 57 homens, com 34 positivos e 23 negativos e 47 mulheres, com 27 positivas e 20 negativas. A menor expressão do FRAXA foi 3% nos homens e 5,4% nas mulheres e a maior 36% e 37,1%, respectivamente. Comparando as técnicas imuno-histoquímica e PCR (considerado o padrão-ouro) nos homens observaram-se sensibilidade 84,2%; especificidade 100%; acurácia 94,2%. Comparando citogenética com PCR nos homens, encontraram-se sensibilidade 100%;

especificidade 61,1%; acurácia 74,5%. A citogenética exige profissional qualificado, cultura prolongada, tendo boa sensibilidade em homens. As vantagens da imuno-histoquímica são: rapidez, baixo custo e facilidade de obtenção das amostras de bulbo de cabelo. A PCR é técnica versátil, rápida, com alta sensibilidade e especificidade com desvantagem em relação às mulheres de não diferenciar as homozigotas normais das heterozigotas afetadas. **Conclusões:** Houve correlação positiva e significativa entre homens com a SXF pela imuno-histoquímica comparada à PCR e citogenética. A PCR mostrou-se eficiente como triagem da SXF nos homens quando comparada com citogenética e imuno-histoquímica devido à ausência de falso-positivos. Fragilidade cromossômica em não afetados pode ser devido à presença de outros sítios frágeis. Todas as técnicas imuno-histoquímica, citogenética e PCR, isoladamente, não detectam portadores da pré-mutação e mulheres com mutação completa.

Palavras-chave: Síndrome do X frágil, FRAXA, imuno-histoquímica, reação em cadeia da polimerase.

Abstract

The fragile X syndrome (FXS), common cause of hereditary mental retardation (MR) is caused by a mutation in the gene *FMR1* characterized by a not translated CGG expansion in extremity 5'. In the population, this expansion varies from five to 52 repetitions. Carriers of 52 to 200 copies (premutation) show a normal production of the FMRP protein, but they can transmit an expanded mutation to the following generation. Individuals FXS have more than 200 copies (full mutation) which result in gene methylation and inactivation hindering the expression of the FMRP. Absence of FMRP is responsible for the MR. Female carrying the full mutation presents various degrees of MR due to random inactivation of the X chromosome. The FXS is identified by the presence of a fragile site (FRAXA) located in the Xq27.3 region. The immunohistochemical method allows the detection of the FMRP expression in the hair bulb. Affected individuals disclose decreased levels of FMRP than controls. The polymerase chain reaction (PCR) represents the best screening method to identify FXS affected individuals. **Objectives:** 1) to evaluate the effectiveness of the immunohistochemical technique in the identification of suspected FXS patients; 2) to compare three techniques used in the diagnosis of FXS: immunohistochemical, cytogenetic and PCR. **Methods:** Were selected 121 patients with signs and symptoms consistent with a probable diagnosis of FXS. Fifty-nine (48.8%) men and 62 (51.2%) were women. As negative controls were used 90 healthy individuals with 75 to 100% of FMRP expression. **Results:** Among the 113 patients that underwent immunohistochemical testing, 54 were men (17 being positive, 28 negative and nine with dubious results) and 59 were women with seven positive, 27 negative and 25 with dubious results. Among the 119 individuals that underwent PCR, 57 were men (with 20 positive and 37 negative results) and 62 women (with three negative and 59 showing dubious results). Of the 104 patients analyzed by cytogenetic testing were men (with 34 positives and 23 negatives results) and 47 were women (with 27 positive and 20 negatives results). The FRAXA lower expression was detected in 3% of men and 5.4% of women

and the greater expression was 36% and 37.1%, respectively. Comparing the immunohistochemical technique and PCR (considered the gold-standard method) in men was observed a sensitivity of 84.2%; and a specificity of 100%; the accuracy was 94.2%. Comparing cytogenetic analysis and PCR in men, the sensitivity of the analysis was 100% and its specificity of 61.1%; accuracy was 74.5%. The cytogenetic analysis requires a qualified professional, a prolonged cell culture time its sensitivity being satisfying mainly in men. The advantages of the immunohistochemical are its shorter execution time, low cost, and facility to obtain the hair bulb samples. The PCR is a fastest technique, versatile, with high sensitivity and specificity. The disadvantage of this test being its incapacity to differentiate the normal homozygous from the affected heterozygous women. **Conclusion:** A positive correlation was found between FXS affected men when comparing the immunohistochemical technique to PCR and to cytogenetic analysis. The PCR was considered an efficient method in detecting the FXS in men when compared to cytogenetic analysis and immunohistochemical technique mainly due to the absence of false positive results. The presence of chromosome fragility in non affected individuals can be due to the presence of other fragile sites. Considering all the three techniques, immunohistochemical, cytogenetic and PCR, can be concluded that, itself, all are ineffective in the identification of premutation carriers and in women with full mutation.

Word-key: Fragile X syndrome, FRAXA, immunohistochemical, polimerase chain reaction.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Histórico

Desde o final do século XIX observações intrigantes despertaram a curiosidade dos pesquisadores: a preponderância significativa de homens em instituições para pessoas com comprometimento intelectual. A frequência de homens, nessas instituições, chegava a ser 25% maior do que a de mulheres não sendo, na época, possível encontrar explicação plausível para esse fato (Sherman, 1991).

Em meados do século XX, na Inglaterra, J. Purdon Martin e Julia Bell (1943) descreveram uma família com 11 homens afetados por retardo mental, em duas gerações e provenientes de mães intelectualmente normais. O heredograma da família era fortemente sugestivo de herança ligada ao cromossomo X. Subsequentemente, outras famílias com retardo mental de herança ligada ao cromossomo X foram descritas e estes estudos levaram Lehrke (1972) a postular a provável influência de genes localizados no cromossomo X sobre a inteligência. O cromossomo X deveria conter vários *loci* que, quando mutados, originariam várias síndromes de retardo mental. Os estudos de irmandades também corroboravam esta hipótese, pois sempre foram observados mais pares de irmãos do que pares de irmãs com retardo mental (Priest *et al.*, 1961; Turner e Turner, 1974; Herbst e Miller, 1980). Por outro lado estudos também evidenciavam a ocorrência de homens assintomáticos que seriam transmissores de comprometimento intelectual em famílias de indivíduos afetados (Dunn *et al.*, 1963).

Em 1969, Lubs estudando os cromossomos dos indivíduos afetados de uma família na qual tanto a mãe como dois de seus filhos apresentavam comprometimento intelectual, observou uma falha peculiar (sítio frágil) próxima à extremidade distal do braço longo do cromossomo X. Algumas mulheres heterozigotas quanto ao gene da síndrome também apresentavam este cromossomo X com a falha, que foi denominado de cromossomo X marcador. O cromossomo X

marcador foi também observado em uma família brasileira (Escalante *et al.*, 1971; Escalante e Frota-Pessoa, 1973), sendo esta a segunda descrição do marcador citogenético. Havia, assim, uma forma de retardo mental de herança ligada ao X associada a uma peculiaridade da morfologia desse cromossomo. Essa associação foi confirmada nas genealogias descritas por Giraud *et al* (1976), Harvey *et al* (1977) e Sutherland (1977a).

Nos anos 70, pesquisadores procuravam observar que outros sinais e sintomas poderiam ocorrer associados ao retardo mental e de herança ligada ao cromossomo X. Em algumas famílias, foi descrito que os indivíduos afetados do sexo masculino apresentavam aumento do volume dos testículos (macrorquidia) (Escalante *et al.*, 1971; Turner *et al.*, 1975; Cantú *et al.*, 1976; Bowen *et al.*, 1978; Cantú *et al.*, 1978).

Sutherland (1977a;b) descobriu que condições especiais no meio de cultura de linfócitos favorecia a expressão do sítio frágil do cromossomo X. Isso permitiu a Turner *et al* (1978) estudarem citogeneticamente várias famílias com retardo mental ligado ao cromossomo X inclusive aquelas em que ocorria a macrorquidia. Os autores concluíram que o retardo mental associado ao X marcador e à macrorquidia representavam a mesma entidade genética. A partir de então, fragilidade no cromossomo X foi sendo detectada em várias famílias, como as estudadas por Sutherland e Ashforth (1979), Howard-Peebles *et al* (1979), Howard-Peebles *et al* (1980) e Vianna-Morgante *et al* (1982). Em 1981, Richards *et al.* estudaram os cromossomos dos indivíduos da família inicialmente descrita por Martin e Bell (1943) e detectaram o sítio frágil característico no cromossomo X nos indivíduos afetados dessa família. Sugeriram que a síndrome até então denominada de Martin-Bell para identificar o quadro clínico associado ao cromossomo marcador passasse a ser chamada de síndrome do X frágil (SXF), como é referida até hoje. A citogenética representou, portanto, importante marco inicial das pesquisas laboratoriais relacionadas à SXF.

Entre 1969 e 1978 os estudos concentraram-se principalmente na caracterização dos sinais e sintomas da síndrome e sua distinção das demais síndromes de retardo mental ligadas ao cromossomo X. Muitos autores tentaram estudar as relações entre os achados clínicos e os resultados dos exames citogenéticos, mas essas relações não foram estabelecidas com muita precisão na época, continuando a se acreditar que a síndrome do X frágil se caracterizava por retardo mental de grau variável, sem associação com nenhuma alteração fenotípica marcante. Posteriormente, alguns sinais físicos e comportamentais foram sendo observados nos indivíduos afetados, permitindo delinear um quadro clínico característico, tais como: orelhas grandes; hipotonia e macrorquidismo. Algumas destas características foram constatadas também em uma parte das mulheres (Fryns, 1986), mostrando que a síndrome afetava pessoas de ambos os sexos. No entanto, os sinais clínicos presentes nas mulheres eram, em geral, mais brandos do que os observados nos homens afetados das mesmas famílias.

Os estudos das famílias com indivíduos afetados pela síndrome do X frágil mostraram logo que a síndrome seguia um modelo de herança incomum, como discutido por Sherman *et al* (1985). Homens e mulheres portadores da SXF podiam ou não apresentar as características da síndrome. As mulheres que manifestavam sinais e sintomas da síndrome apresentavam maior risco de ter crianças com a síndrome do que as portadoras do gene alterado sem comprometimento intelectual. Em famílias com várias gerações ficava evidente que as mulheres portadoras da pré-mutação do gene alterado que faziam parte das gerações mais antigas tinham menor chance de ter crianças com a síndrome do que as mulheres portadoras das gerações mais recentes. Esse fenômeno ficou conhecido como “antecipação genética ou paradoxo de Sherman” (Opitz, 1986).

A década de 80 caracterizou-se por uma busca incansável de métodos precisos que permitissem o aconselhamento genético, com base no estudo cromossômico dos portadores

assintomáticos do gene mutado e também por meio de estudos moleculares, a fim de esclarecer o padrão de herança da síndrome do X frágil.

Finalmente, em 1991, foi identificado o gene que está alterado na síndrome do X frágil: o gene *FMRI* (*Fragile X Mental Retardation I*). A identificação do gene *FMRI* foi possível graças aos esforços de três grupos de pesquisadores independentes que clonaram ao mesmo tempo sondas de DNA que detectavam alterações no gene responsável pela síndrome do X frágil (Oberlé *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). O gene *FMRI* é caracterizado por uma seqüência repetida dos trinucleotídeos citosina-guanina-guanina (CGG) que, em pessoas normais, alcança até 52 repetições. Porém, este gene *FMRI* pode-se apresentar de duas formas alteradas: 1) mutação completa, presente nas pessoas com a síndrome onde o indivíduo apresenta mais de 200 repetições dos trinucleotídeos CGG; 2) pré-mutação, presente nas pessoas sem alterações fenotípicas e comprometimento mental, com uma expansão intermediária de 52 a 200 cópias de CGG. Nas pessoas com a pré-mutação, o gene *FMRI* funciona e comanda a síntese da proteína, mas na mutação completa ele fica silencioso, mostrando que a ausência da proteína FMRP é, realmente, a responsável pelo fenótipo da síndrome e que, provavelmente, não sofre influência de genes adjacentes (Pieretti *et al.*, 1991; Willemsen *et al.*, 1997, 1999; Boy *et al.*, 2001). Ficavam, assim, explicados vários aspectos peculiares da transmissão e da manifestação do gene *FMRI* alterado.

O produto do gene *FMRI*, a proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), caracteriza-se por ser uma proteína intracelular que regula a produção de várias proteínas. O fato de uma mutação do gene *FMRI* afetar várias proteínas explica os vários sinais e sintomas da síndrome do X frágil (Li *et al.*, 2001).

Atualmente, os métodos moleculares, em particular o Southern blot e a reação em cadeia da polimerase (PCR), são considerados os mais precisos e específicos, permitindo assim, melhor

acurácia na triagem e no diagnóstico da SXF. Além desses, um outro método recentemente identificado para o diagnóstico da SXF é o imuno-histoquímico, capaz de auxiliar no rastreamento de deleções (De Vries *et al.*, 1998).

Em 1970, pesquisadores já utilizavam bulbos de cabelo humano em pesquisas biomédicas, em especial para diagnóstico de erros inatos do metabolismo em particular, na detecção de mulheres portadoras de anormalidades ligadas ao cromossomo X (Gartler *et al.*, 1969, 1971; Vermorken *et al.*, 1978). Em 1999, Willemsen *et al.* resolveram testar o bulbo de cabelo para permitir um diagnóstico menos invasivo em pacientes suspeitos da SXF, que permitiria detectar se a proteína FMRP estaria ou não sendo expressa, por meio da técnica de imuno-histoquímica. O interesse em detectar a presença ou ausência da proteína FMRP pelo exame do bulbo de cabelo se deve ao fato de sua linhagem embrionária ser próxima à das células dos neurônios. A proteína FMRP é expressa em muitos tecidos, porém é mais abundante nas células da pele e dos neurônios e parece ter um papel na maturação estrutural e funcional de sinapses (Willemsen, 1997; Thompson & Thompson, 2002). A falta da proteína FMRP parece apenas atrasar o desenvolvimento dos neurônios, não os danificando e nem os destruindo. Apesar deste teste imuno-histoquímico não ter seu uso difundido é de grande valor, pois permite diagnosticar também os raros casos da SXF decorrentes de deleções intragênicas, que são de origem materna (Willemsen, 1997).

O exame citogenético e o histórico familiar foram e continuam sendo em muitos centros clínicos a base para o aconselhamento genético. Porém, os resultados obtidos nos exames citogenéticos não têm a precisão necessária para calcular os riscos de prole afetada, onde homens e mulheres portadores da pré-mutação, porém intelectualmente normais, não manifestam o X frágil, pois o gene *FMRI* ainda é funcional (Weaver e Sherman, 1987; Navajas *et al.*, 1987).

Esses avanços vieram permitir que, atualmente, diagnóstico e aconselhamento genético

sejam feitos com maior segurança (Gane e Cronister, 2002). O estudo direto do DNA da região do gene *FMR1* permite diagnosticar as pessoas com a síndrome do X frágil e identificar seus parentes normais e os portadores da pré-mutação ou da mutação completa.

A pré-mutação do gene *FMR1* também pode causar alguns sinais e sintomas característicos em seus portadores. Nas mulheres com a pré-mutação, a menopausa precoce é mais freqüente do que na população geral (Alligham-Hawkins *et al.*, 1999). Homens idosos portadores podem apresentar algumas alterações neurológicas típicas, conjunto de sintomas que recebeu o nome de FXTAS (Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome) (Hagerman *et al.*, 2001; Jacquemont *et al.*, 2006).

2. Introdução

2.1 Definição

A síndrome do X frágil é causada por mutações no gene *FMRI* na região Xq27.3, conforme ilustrado na figura 1. Esta síndrome é a segunda causa genética, mais importante, de retardo mental sendo apenas menos freqüente que a síndrome de Down. Sabe-se que a síndrome do X frágil acomete predominantemente homens, com incidência de 1:4000 enquanto que nas mulheres a incidência é de 1:6000 (Turner *et al.*, 1996; Willemsen *et al.*, 2003). No sexo masculino, a síndrome do X frágil contribui com 3 a 6% do retardo mental em indivíduos com história familiar positiva de retardo mental não associado a malformações físicas congênitas (Mingroni-Netto, 1995; Thompson & Thompson, 2002; Jorde *et al.*, 2004). Existe pequena discrepância quanto à freqüência global de portadores da SXF: Warren e Sherman (2001), em estudo em diferentes grupos étnicos estimam que, em todo o mundo, uma em cada 9.000 mulheres e um em cada 4.500 homens sejam afetados pela síndrome do X frágil e que um em cada 1.000 homens e uma em cada 400 mulheres sejam portadores de pré-mutação.

Na população geral, uma em cada 259 mulheres pode ser portadora da pré-mutação, com risco de ter tanto filhos como filhas afetadas (Rousseau *et al.*, 1995). A SXF aparentemente incide de forma similar em todos os grupos étnicos e é a responsável por, aproximadamente, 14% de todos os retardos mentais idiopáticos, no sexo masculino, e por um terço de todos os retardos mentais ligados ao X (Turner *et al.*, 1996). Apesar dessa significativa prevalência, somente uma fração dos indivíduos afetados recebe diagnóstico apropriado, mesmo em países desenvolvidos.

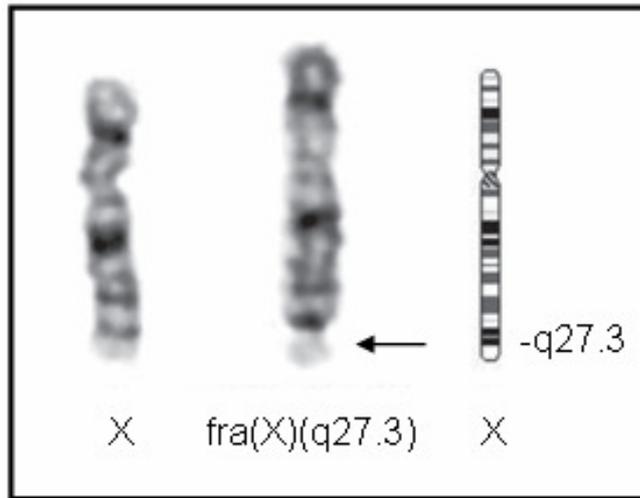


Figura 1 – Par de cromossomo X com a seta indicando o sítio frágil X na região Xq27.3. Ao lado, o ideograma do cromossomo X. Fonte: www.genetics.com.au/pdf/factSheets/FS32.pdf, acessado em 12/05/2007 com modificações.

Para explicar a elevada incidência da SXF, mesmo com a perda constante de alelos instáveis através de afetados, encontramos em Chakrvarti (1992) e Morton e Macpherson (1992) modelos populacionais em que se mantêm na população alelos “protomutados”, ou seja, com maior probabilidade de expansão dos trinucleotídeos, porém estáveis. Chakrvarti (1992) chegou a propor que tais alelos poderiam se transmitir inalterados por cerca de 90 gerações, o que explicaria em parte a alta incidência do gene da SXF.

2.2 Características fenotípicas e comportamentais

Apesar de não existir nenhum elemento que isoladamente possa ser considerado como característica específica da síndrome do X frágil, o conjunto de características apresentadas por estes pacientes, conforme retrata a figura 2, permite, na maior parte das vezes, realizar o rastreamento dos possíveis portadores da SXF (Butler, 1993).



Figura 2 – Dismorfias faciais em: A – mães e filhos portadores da mutação completa; B – indivíduos afetados pela SXF. Fonte: pacientes atendidos no Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB), Brasília, 2006-2007.

Os achados fenotípicos presentes em pacientes afetados pela SXF são bastante variáveis, incluindo aspectos morfológicos e comportamentais. Tais achados estão representados por: 1) retardo mental; 2) distúrbios de atenção; 3) hiperatividade; 4) macrorquidia; 5) contato visual pobre – estrabismo; 6) aversão ao contato físico; 7) linguagem perseverativa; 8) movimentos rítmicos das mãos; 9) face alongada e estreita; 10) olhos grandes; 11) orelhas grandes e em abano; 12) palato alto; 13) mandíbula e fronte proeminentes; 14) hipotonia; 15) hiperextensibilidade articular (metacarpofalangeana); 16) prega palmar única; 17) sulco plantar; 18) pés planos; 19) escoliose; 20) má-oclusão dentária e, 21) características autísticas.

Foram documentados também outros problemas de comportamento como irritabilidade e agressividade (Hagerman *et al.*, 1991). Se tais problemas são mais prevalentes entre os indivíduos com a SXF do que entre outros tipos de retardados ainda é motivo de controvérsia (Fisch, 1993).

Apesar da grande variabilidade de sinais fenotípicos evidenciados nos indivíduos com a síndrome do X frágil, o rastreamento torna-se difícil em crianças, visto que as características que compõem o fenótipo do adulto freqüentemente não são encontradas nos indivíduos em fase pré-púbere. Nas mulheres afetadas, os achados fenotípicos são mais discretos em virtude da inativação aleatória de um dos cromossomos X, causando efeito compensatório benéfico sobre a expressividade do gene mutado (Riddle *et al.*, 1998).

Na tentativa de facilitar o diagnóstico da SXF foi proposta uma listagem de sinais e sintomas para avaliar as características físicas, comportamentais e anamnéticas dos pacientes, baseada nos trabalhos de Hagerman (1987) e Hagerman *et al* (1991), modificada por Butler *et al* (1991), que engloba 15 das características mais freqüentemente encontradas entre indivíduos afetados pela SXF (Tabela 1), com uma única modificação: o item referente à presença de olhos pálidos e azuis, foi substituído pelo item concernente à face alongada, por ter esta maior valor discriminativo. Cada item possui um valor variável de zero a dois, atribuindo-se valor zero às características ausentes, valor um à presença das características no passado ou nos casos de condições limítrofes ou questionáveis e, finalmente, valor dois às características definitivamente presentes (Giangreco *et al.*, 1996). Segundo Butler *et al* (1991), o indivíduo que totalizar uma contagem de pontos igual ou superior a 11, deverá ser considerado como um provável portador da SXF. Este valor é considerado o ponto de corte para a indicação de testes complementares.

Tabela 1 – Lista de características físicas, comportamentais e anamnéticas frequentemente encontradas em pacientes com X frágil (Butler *et al.*, 1991; Hagerman, 1997).

| Características | Frequência % |
|---|---------------------|
| Retardo Mental (RM) | 100 |
| História familiar de RM ou autismo ⁽¹⁾ | 73,7 |
| Distúrbio de atenção | 63,2 |
| Hiperatividade | 73,7 |
| Contato visual pobre | 36,8 |
| Aversão ao contato físico ⁽²⁾ | 63,2 |
| Linguagem repetitiva | 52,6 |
| Movimentos rítmicos das mãos e braços | 47,4 |
| Face alongada | 64 |
| Orelhas grandes e proeminentes | 94,7 |
| Prega simiesca ou linha de Sydney | 36,8 |
| Mordedura das mãos ⁽³⁾ | 36,8 |
| Hiperextensibilidade articular (metacarpofalangeana) ⁽⁴⁾ | 57,9 |
| Sulco plantar | 83,3 |
| Macrorquidismo ⁽⁵⁾ | 80 |

1) Três gerações de parentes, tanto maternos como paternos;

(2) Aversão ao toque ou a outros estímulos tácteis normalmente não aversivos;

(3) Mordedura das mãos inclui mordedura dos punhos, excluindo-se o ato de comer unhas;

(4) Considerar a hiperextensibilidade das articulações metacarpo-falangeanas como positiva quando os dedos II-V podem ser concomitantemente dorsifletidos até $\geq 90^\circ\text{C}$, enquanto a palma for mantida reta sobre a mesa;

(5) Volume testicular com desvio padrão ≥ 2 para a idade.

As características clínicas mais notáveis dos homens afetados pela SXF são retardo mental e macrorquidia. O grau de retardo mental é extremamente variável, mesmo entre indivíduos de uma mesma família. Existem afetados que apresentam desde retardo mental

profundo até inteligência limítrofe. Contudo, o retardo mental grave parece ser mais freqüente, ocorrendo em 42% dos homens afetados, enquanto 35% das mulheres heterozigotas apresentam retardo mental leve ou limítrofe. (Mingroni-Netto, 1995).

Foi sugerido por diversos autores que não ocorreria a regressão ou degeneração de funções intelectuais já adquiridas, mas sim uma desaceleração ou parada no desenvolvimento cognitivo, que se reflete como um rebaixamento do QI à medida que a idade avança (Hagerman *et al.*, 1989; Hodapp *et al.*, 1990; Fisch *et al.*, 1991). Verificou-se também a existência de uma correlação negativa entre o QI e a idade dos homens afetados pela síndrome, constatando que os homens de QI mais elevado sofrem maiores decréscimos de QI com a idade e que estes são portadores de menores amplificações de trinucleotídeos CGG do que os homens de QI mais baixo, que não apresentam decréscimo de QI e possuem grandes amplificações CGG (Staley *et al.*, 1993; Mingroni-Netto 1995). Mulheres de QI mais baixo tendem a exteriorizar características físicas mais típicas e marcantes (Fryns, 1986; Cianchetti *et al.*, 1991). O fato de 35 a 50% das mulheres heterozigotas manifestarem algum grau de comprometimento mental (Sherman *et al.*, 1984, Sherman *et al.*, 1985; Navajas, 1985) era indicativo de que a SXF não era causada por gene recessivo. Logo, indivíduos do sexo masculino portadores da mutação completa apresentam sempre um comprometimento mental, enquanto aproximadamente 65% das mulheres com a mutação completa apresentam um moderado retardo mental (Willemsen *et al.*, 1999).

Berry-Kravis e Huttenlocher (1992) e Berry-Kravis e Sklena (1993) investigaram a produção de AMP-cíclico em afetados com a SXF e verificaram redução significativa quando comparados à de indivíduos normais, ou à de pacientes com retardo mental conseqüente a outras causas e à de pacientes autistas. É possível que as reações em cascata que envolvem o AMP-cíclico estejam alteradas nos neurônios dos pacientes afetados pela síndrome e contribuam para a gênese do retardo, principalmente no aspecto da deficiência de memória de curto prazo.

Portadores de X frágil de ambos os sexos têm uma expectativa média de vida considerada normal. Apesar das características descritas, os portadores de X frágil podem ser férteis. Porém, aqueles pacientes que apresentam retardo mental mais severo, raramente se reproduzem (Sherman, 2000; Boy *et al.*, 2001).

Embora macrorquidia não esteja presente em todos os indivíduos afetados, estima-se que cerca de 80% dos adultos a apresentem, mas entre crianças e adolescentes ela é menos freqüente. Entre os pré-púberes ela ocorre apenas em cerca de 20% dos afetados e, portanto, é uma característica de baixo valor diagnóstico nesta faixa etária. O macrorquidismo, entretanto, pode ser observado em pacientes com retardo mental portadores de afecções outras que não a síndrome do X frágil (Merenstein *et al.*, 1996; Hagerman, 2002; Pandey, 2004).

Algumas características importantes para o diagnóstico são: atraso na aquisição da fala, associado à fala geralmente acelerada e repetitiva (Turner *et al.*, 1980b; Nielsen *et al.*, 1983; Turner e Jacobs, 1983), com alteração de ritmo, fluência, pausas inadequadas e ao mesmo tempo, longos monólogos (Paul *et al.*, 1984; Hanson *et al.*, 1986; Hagerman, 1987; Sudhalter *et al.*, 1991). Pequeno percentual de pacientes portadores de retardo mental severo, podem mesmo não alcançar nenhuma expressão verbal (Hagerman *et al.*, 1991).

Achados adicionais como: pele macia, hiperextensibilidade articular dos dedos, palato em forma de arco, pé plano e peito escavado (Turner *et al.*, 1980; Hagerman *et al.*, 1984), levantaram a hipótese da existência de uma displasia do tecido conjuntivo (Opitz *et al.*, 1984). Isso motivou a investigação de anomalias cardíacas, tendo sido então observada a presença de prolapso ou frouxidão da válvula mitral em 22 a 55% dos pacientes adultos estudados (Loehr *et al.*, 1986; Screeram *et al.*, 1989). Embora alterações anatômicas do tecido conjuntivo não tenham sido encontradas em crianças, estudo histológico em biópsias de pele, válvulas cardíacas e aorta de paciente afetado do sexo masculino, demonstraram uma orientação mais irregular das fibras de

elastina, além destas estarem presentes em menor número (Waldestein *et al.*, 1987; Waldestein e Hagerman; 1988).

Em relação às mulheres afetadas foram registrados problemas emocionais e de comportamento como ansiedade, depressão, personalidade esquizóide, timidez, hiperatividade, deficiência de atenção, estereotípias e agressividade (Reiss *et al.*, 1986; Reiss *et al.*, 1988; Reiss *et al.*, 1989; Borghgraef *et al.*, 1990; Cronister *et al.*, 1991 e Lachiewicz, 1992). Embora alguns estudos sugerissem que as heterozigotas de inteligência normal apresentavam também maior incidência de perturbações psiquiátricas como a depressão, um estudo rigorosamente controlado de mulheres portadoras somente da pré-mutação indicou que estas não diferem da população controle na frequência de alterações de comportamento (Reiss *et al.*, 1993). Freund *et al.* (1993), referem que a maioria das mulheres com a mutação completa, apresentava distúrbios de humor e precária interação social. Geralmente existe variação ampla de decréscimo de características clínicas em mulheres portadoras da mutação completa. Aproximadamente 60% das mulheres portadoras têm de leve a moderado prejuízo mental, enquanto as 40% restantes têm capacidade intelectual normal (Willemsen *et al.*, 2003).

A base molecular para a variação fenotípica em ambos os sexos parece estar relacionada à variação do número de neurônios no cérebro que expressam a proteína FMRP. Homens afetados, em mosaico, mostram uma combinação variável de alelos pré-mutados e mutados, sendo, no entanto, mais freqüente a predominância de alelos com a mutação completa. Em mulheres portadoras da mutação completa os sinais e sintomas da SXF embora mais leves do que em homens, podem ser ainda menos evidentes dependendo do cromossomo X inativado (Willemsen *et al.*, 2003).

Curiosamente, o estudo dos ovários através de ultra-sonografia em mulheres heterozigotas revelou que estes podem estar aumentados (Turner *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1990), mas a razão

para o aumento de volume dos testículos e dos ovários ainda permanece por esclarecer.

Em muitas das genealogias já estudadas foram descritos indivíduos afetados que podem ser chamados de autistas ou que apresentam características "autistiformes". Brown *et al* (1986), em revisão da literatura, encontraram que 7,7% dos autistas estudados citogeneticamente apresentam a SXF e dentre 434 afetados pela síndrome, 21% eram autistas. Porém, a estimativa precisa dessas proporções sempre foi dificultada pela falta de homogeneidade nos critérios de diagnóstico de autismo. Hagerman *et al* (1991) e Fisch (1992) reuniram os achados das várias amostras de autistas da literatura, na maioria das quais tinham sido utilizados os critérios de diagnóstico de autismo estabelecidos pelo DSMIII-R (Diagnostic and Statistical Manual DSMIII-R, American Psychiatric Association) e encontraram respectivamente que 6,5% e 5,4% dos autistas estudados apresentam a SXF. Em estudos sobre meninas autistas, Hagerman *et al* (1991) verificaram a proporção de 4% com a SXF. Logo depois Malmgren *et al* (1992), utilizando sondas de DNA específicas para o gene *FMRI* em amostra de 22 crianças autistas, detectaram sete afetadas pela SXF, reforçando a idéia de que o autismo é uma entidade heterogênea do ponto de vista genético. Estes pacientes autistas expressam vontade de se relacionar, mas mostram ao mesmo tempo um comportamento evasivo, fugindo ao contato visual e evitando posicionar-se frontalmente à pessoa com quem estão se encontrando (Wolff *et al.*, 1989).

Estudos registraram que mulheres com a pré-mutação tendem a entrar em menopausa mais cedo que as não portadoras, sugerindo que a menopausa precoce seja o extremo do espectro de efeitos ovarianos da pré-mutação. Menopausa precoce ocorre em cerca de 24% das mulheres portadoras da pré-mutação (Allingham-Hawkins *et al.*, 1999; Vianna-Morgante *et al.*, 1999) e estima-se que 10% das mulheres da população em geral que apresentam menopausa antes dos 40 anos de idade sejam portadoras da pré-mutação do gene *FMRI* (Sherman, 2000). Entretanto, quando a menopausa precoce é do tipo familiar, a frequência de portadoras da pré-mutação baixa

para cerca de 14% (Sherman, 2000).

Outras alterações observadas em pacientes portadores da SXF são alterações anatômicas no tamanho do cerebelo (Reiss *et al.*, 1991) e nas ramificações dos dendritos (Irwin *et al.*, 2000). Alguns trabalhos sugerem ainda que existem características eletroencefalográficas próprias da SXF (Finelli *et al.*, 1985; Wisniewski *et al.*, 1985; Sanfilippo *et al.*, 1986; Musumeci *et al.*, 1988). Convulsões foram verificadas em 15 a 20% das pessoas afetadas (Hagerman, 2002). Outros estudos sugerem que a incidência de filhos gêmeos é maior entre as mães portadoras da pré-mutação (Turner *et al.*, 1994).

Um subgrupo de homens idosos portadores da pré-mutação apresenta alterações neurológicas peculiares (Hagerman *et al.*, 2001; Jacquemont *et al.*, 2003; Jacquemont *et al.*, 2006), que foram englobadas na chamada síndrome FXTAS (*Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*). Esta síndrome, de início insidioso, geralmente eclode ao redor dos 50 ou 60 anos e caracteriza-se por alterações neurológicas progressivas. Estudos realizados nos Estados Unidos, Holanda e Austrália registram a ocorrência da FXTAS em 20 a 30% dos homens com a pré-mutação. As alterações incluem tremor, dificuldade na marcha e no equilíbrio, além de ansiedade e perda de memória. A ressonância magnética revelou perda do volume cerebral e cerebelar e intensidades alteradas dos sinais dos pedúnculos cerebelares medianos (Hagerman *et al.*, 2003). A FXTAS parece ser uma das causas genéticas mais comuns de tremor, ataxia e demência entre homens idosos.

2.3 Patogênese

2.3.1 Gene *FMRI*

O gene *FMRI* causador da SXF apresenta 38kb de comprimento, é composto por 17 exons e 16 introns. Mostra-se altamente conservado do ponto de vista evolutivo entre as várias espécies (Verkerk *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993) e chega a apresentar 95% de homologia com o gene *fmr1* encontrado em camundongo, o que torna este animal um bom modelo para estudar a SXF (Oostra, 1996). O gene *FMRI* codifica pelo menos 12 tipos diferentes de mRNA originados por meio de processamento alternativo do pré-mRNA (*splicing* alternativo). A construção de anticorpos artificiais contra regiões da proteína FMRP permitiu detectar quatro produtos protéicos diferentes, os quais se expressam em vários tecidos, ocorrendo em maior proporção no tecido cerebral e gônadas (Devys *et al.*, 1993; Verkerk *et.*, 1993).

O gene se expressa de maneira forte e generalizada no início do desenvolvimento embrionário em camundongos, porém nos adultos a expressão é mais localizada, concentrando-se no cérebro (hipocampo e cerebelo) e túbulos seminíferos. Em tecidos humanos o resultado foi semelhante (Hinds *et al.*, 1993).

2.3.2 Mutação no cromossomo X

A mutação no gene *FMRI* ocorre pela expansão de um trecho instável de repetições de trinucleotídeos CGG na extremidade 5' não traduzida do gene *FMRI*. Essas repetições são normalmente polimórficas, de maneira estável, na população geral, podendo alcançar até cerca de 52 cópias. Portadores de 52 a 200 cópias dessa seqüência (pré-mutação) não apresentavam alterações fenotípicas, além de, praticamente, nenhuma manifestação citológica do sítio frágil

(Carakushansky, 2001; De Vries *et al.*, 2003; Willemsen *et al.*, 2003). Porém, vale a pena ressaltar que por se tratar de uma alteração instável, possui uma tendência cada vez maior a se transformar em mutação completa, à medida que é transmitida de geração em geração. Trabalhos recentes têm mostrado que mulheres portadoras da pré-mutação do gene *FMRI* apresentam alteração na função ovariana e perda de fertilidade (Wittenberger *et al.*, 2007). Quando o indivíduo é portador de mais de 200 cópias, caracteriza-se a mutação completa, que resulta em metilação da ilha CpG adjacente ao gene. Esta metilação resulta no bloqueio das bases citosina por grupos metila, geralmente associada à ausência de transcrição e, conseqüentemente, inativação do gene, impedindo a expressão da proteína FMRP (Figura 3) (Oberlé *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Sutcliffe *et al.*, 1992; Willemsen *et al.*, 2003). Não se pode estabelecer relação simples e direta entre o número de repetições CGG e o grau de comprometimento do indivíduo afetado. Assim, uma pessoa com mutação completa, com 500 repetições, não terá necessariamente um quadro clínico mais grave do que outra pessoa com mutação completa que apresente 300 repetições CGG. O gene *FMRI* estará silencioso nos dois casos, mas os sintomas poderão ser variados (Brown, 2002).

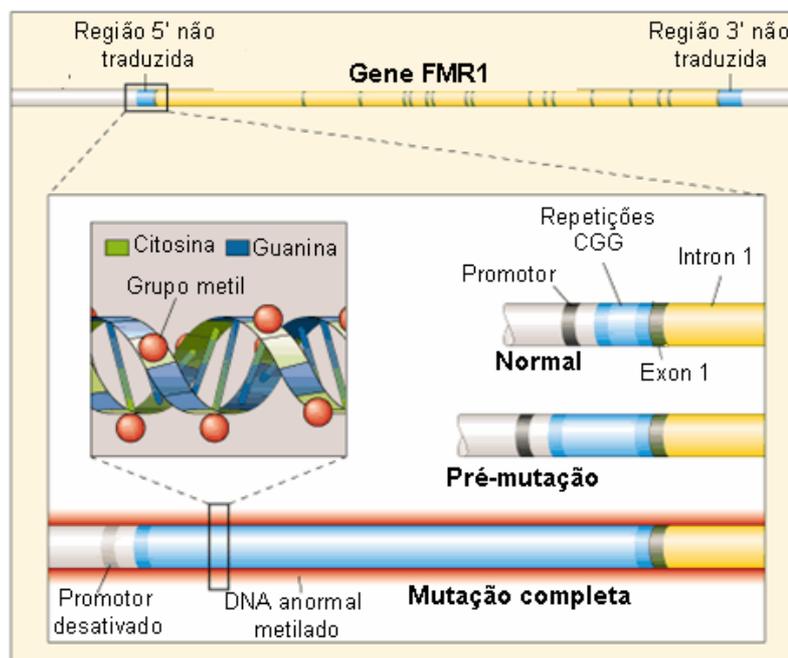


Figura 3 – Ilustra o exon 1 do gene *FMR1* no estado normal, pré-mutado e mutado metilado. Fonte: http://www.bioquest.org/lifelines/chautauqua_2004/llol_temp_blue.php?project_id=51 acessado 20/05/2007 com modificações.

Nos indivíduos com a mutação completa pode ocorrer instabilidade ao nível somático, caracterizada por um mosaico de repetições CGG de diferentes tamanhos. Ou seja, algumas células têm a pré-mutação e a proteína é produzida, enquanto outras apresentam a mutação completa, estando o gene inativo (Rousseau *et al.*, 1991). O estudo desses “mosaicos” mostrou que a pré-mutação presente em certo número de suas células surgiu a partir da mutação completa que herdaram. Por ser muito instável, a mutação completa pode ter o tamanho da repetição CGG alterado nas divisões celulares durante o desenvolvimento embrionário (Mingroni-Netto *et al.*, 1996).

Um número de repetições CGG entre 45 e ~55 pode ser estável em certas pessoas mas em outras tender a se expandir quando o gene é transmitido para as gerações seguintes. Por isso os genes com repetições CGG nessa faixa são considerados como fazendo parte de uma “zona intermediária ou cinzenta”. A menor repetição CGG que já se observou expandindo-se para

mutação completa tinha 59 repetições (Nolin *et al.*, 2003).

Em estudos que analisaram a mutação da SXF em várias genealogias (Rousseau *et al.*, 1991; Heitz *et al.*, 1992; Macpherson *et al.*, 1992), destacaram que, até agora, nenhum indivíduo afetado com a mutação completa surgiu em consequência de mutação nova, ou seja, de mutação que não tenha sido herdada, pois todos sempre herdaram de suas mães com pelo menos a pré-mutação. Estudos realizados em vários países confirmam que, nas famílias, as primeiras mutações completas ocorrem na prole de mulheres portadoras da pré-mutação (Yu *et al.*, 1992; Snow *et al.*, 1993; Mingroni-Netto *et al.*, 1997).

Rousseau *et al.* (1991), a partir do estudo de 63 genealogias, observaram que a frequência de indivíduos que apresentam somente a pré-mutação e são retardados (3%) não difere da frequência do retardo da população geral, o que indicaria que o retardo mental não é devido à pré-mutação ou à SXF.

São raros (<1%) os casos em que a síndrome decorre de deleção total ou parcial (Gedeon *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1994; Quan *et al.*, 1995; Hammond, 1997), de mosaicismo (Wöhrle *et al.*, 1992) ou de mutação de ponto no loci *FMRI* (De Boulle *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1994), indicando que existe heterogeneidade genética na origem da SXF, ou seja, pode haver SXF do ponto de vista clínico não associada ao cromossomo X frágil. No entanto, mais de 99% das mutações de *FMRI* são expansões de uma seqüência repetida (CGG)_n. Logo, o fato de os indivíduos afetados possuírem, em sua grande maioria, um único tipo de mutação (expansão de trincas CGG), facilita sobremaneira o diagnóstico e contrasta com o que ocorre em outras doenças hereditárias, como é o caso da fibrose cística, por exemplo, onde cerca de 1000 mutações diferentes foram relatadas (Tsui, 1992; Thompson & Thompson, 2002; Elahi *et al.*, 2006).

2.3.3 Mosaicismo

As mutações completas são mitoticamente instáveis, determinando a ocorrência de mosaicismo, que é estabelecido precocemente, durante a embriogênese. Posteriormente as expansões CGG se estabilizam e se transmitem de maneira clonal (Mingroni-Netto, 1995). Oberlé *et al.* (1991a) observaram que nos homens portadores de mosaicismo a ilha CpG pode estar parcialmente metilada.

A severidade do fenótipo depende tanto do mosaicismo resultando em diferentes tamanhos das repetições como do mosaicismo de repetições metiladas. Alguns pacientes têm mistura de células com tamanhos de repetições que variam desde a pré-mutação até a mutação completa (mosaicismo de tamanho da repetição). De modo semelhante, alguns pacientes têm uma mistura de células com e sem metilação da repetição CGG (mosaicismo de metilação da repetição). Todos os homens com mosaicismo, seja ele de tamanho ou de metilação da repetição, são afetados, mas em geral, têm menor comprometimento mental que aqueles com uma mutação completa em todas as células (Oberlé *et al.*, 1991; Hagerman *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1996). Há controvérsias quanto ao comprometimento mental. De acordo com Wiegers *et al* (1993) não há nenhuma diferença no grau de comprometimento mental nas amostras de mosaicos e não-mosaicos, porém Staley *et al* (1993) encontraram que os mosaicos têm realmente QI mais alto que os não-mosaicos. Rousseau *et al* (1991) verificaram que 15% dos indivíduos com a mutação completa são, na verdade, mosaicos.

2.3.4 Proteína FMRP

A proteína FMRP, produto do gene *FMRI*, associa-se a vários mRNAs produzidos por outros genes e também pelo *FMRI*, regulando a síntese das proteínas que se formam a partir

desses mRNAs. Autores sugerem que a FMRP atua na modulação da tradução, que é prejudicada na ausência dessa proteína causando, assim, a SXF. Segundo os autores, não se sabe exatamente como a falta da FMRP causa o retardo mental, sabe-se apenas que ela é produzida próxima a sinapses, em resposta à ativação de um neurotransmissor, tendo aparentemente um papel importante no desenvolvimento de conexões sinápticas, o que explicaria sua relação com retardo mental (Wittenberger, *et al.*, 2007; Irwin *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 1997).

A partir do gene *FMRI* normal e daquele com a pré-mutação é transcrito um mRNA funcional. Nos indivíduos afetados, isto é, com a mutação completa, o mRNA não é detectado, mostrando que o gene está silencioso. Este silêncio do gene ocorre por hipermetilação de citosinas de uma seqüência de dinucleotídeos CG na ilha CpG no promotor do gene *FMRI*. As seqüências CG estão presentes na região promotora de vários genes e se mantêm desmetiladas quando o gene está ativo (Wittenberger, *et al.*, 2007).

Nas mulheres normais, os genes que estão ativados no cromossomo X ativo apresentam a seqüência CG desmetilada, e no cromossomo X inativo os genes inativados têm esta seqüência CG metilada. No cromossomo X de homens normais, sempre ativo, esta seqüência CG está desmetilada. Nos casos de mutação completa, entretanto, a seqüência CG no gene *FMRI* está sempre metilada (mesmo no cromossomo X ativo), tornando o gene inativo (Otto *et al.*, 1998).

Finalmente, Gibson *et al* (1993) e Siomi *et al* (1993) propuseram que o produto previsto do loco *FMRI* é uma proteína que se liga a RNAs, pois apresenta domínios chamados *KH*, semelhantes a outras proteínas dessa natureza que já foram seqüenciadas. Os autores chamaram a atenção para o fato de que a mutação de ponto identificada por De Boulle *et al* (1993) afeta justamente um desses domínios essenciais à propriedade de se ligar ao RNA. Além disso, Siomi *et al* (1993) demonstraram que o produto de *FMRI* sinteticamente produzido é efetivamente capaz de se ligar a RNA *in vitro*. Ashley *et al* (1993) afirmaram que a proteína tem dois sítios de

ligação com RNA, interage com o seu próprio mRNA e com cerca de 4% dos mRNA transcritos em cérebro fetal.

Foi demonstrado nos estudos de Richards *et al* (1993) que as repetições CGG a 5' do loco *FMRI* são os sítios de ligação de uma proteína nuclear denominada *BP-1*, que também é capaz de se ligar *in vitro* a repetições CGG sintéticas. Quando as repetições CGG estão metiladas, outro complexo protéico se liga à região, indicando que o silenciamento do gene *FMRI* deve resultar da interação entre vários fatores protéicos que influenciam a transcrição.

É interessante notar que os portadores da pré-mutação com número grande de repetições, têm baixos níveis de proteína FMRP e níveis elevados de mRNA. Isso parece se dever à dificuldade de traduzir um mRNA com uma repetição CGG grande, o que levaria à diminuição na síntese da proteína FMRP. A célula passaria, então, a produzir mais mRNA, em uma tentativa de aumentar a síntese da proteína (Tassone *et al.*, 2000a; Tassone *et al.*, 2000b; Hagerman, 2002). Pesquisas em andamento buscam verificar a relação entre essa taxa aumentada de mRNA e alterações neurológicas (Hagerman, 2003).

2.3.5 Transmissão da expansão CGG

Estudos de segregação indicam que o número de trinucleotídeos tende a aumentar a cada geração, durante a meiose feminina, na oogênese e na fase das mitoses pós-zigóticas (podendo gerar mosaicismos cromossômicos). Isto explicaria as diferenças de penetrância do quadro clínico se a mutação é herdada de homem ou de mulher, assintomáticos ou afetados. Quando transmitida pela mulher, o número de repetições de trinucleotídeos tende a aumentar de geração para geração, podendo continuar na categoria de pré-mutação ou transformar-se em mutação completa, caso não sofra interrupção por trincas que estabilizam a sequência como AGG, a cada 9 ou 10 trincas.

Ou seja, a frequência e localização dessas trincas interruptoras influenciam na estabilidade do polimorfismo CGG do gene *FMRI*, que impede que essa região evolua, através de gerações, para a pré-mutação e para a mutação completa. Aparentemente haveria um limiar de 34-38 repetições CGG não interrompidas para a ocorrência de expansões meióticas (Eichler *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1995). O número crescente de prole afetada geralmente é observado nas últimas gerações de uma família afetada. Este fenômeno é conhecido como antecipação genética. Deste modo, a probabilidade de um indivíduo gerar descendentes afetados parece estar vinculada ao número de cópias da repetição CGG que possui. O risco aumenta proporcionalmente ao tamanho da pré-mutação, aproximando-se de 100% quando a expansão tem mais de 100 repetições (Fu *et al.*, 1991; Rousseau *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991; Heitz *et al.*, 1992; Otton *et al.*, 1998).

As mulheres portadoras da pré-mutação têm 50% de chance de transmitir o cromossomo X cujo gene *FMRI* é normal tanto às filhas como aos filhos. Mas, se os filhos herdarem o cromossomo X cujo gene é alterado, poderão ter a pré-mutação ou a mutação completa, dependendo do tamanho da expansão CGG que a mãe possui. Porém se a mãe for afetada, seus filhos terão 50% de chance de serem afetados, isso dependendo da chance de herdarem o cromossomo normal ou aquele portador da mutação. Reiss *et al* (1989) e Hagerman *et al* (1992) salientaram que as mulheres que herdaram o gene de seus pais transmissores normais (até 200 repetições CGG) não apresentam comprometimento algum do ponto de vista cognitivo, nem alterações importantes do perfil psicológico sendo sempre portadoras da pré-mutação. Já as filhas dos homens afetados, receberão apenas o gene com a pré-mutação e não com a mutação completa, assim, pode-se dizer que as pré-mutações em geral se encurtam com a transmissão paterna (Willemsen *et al.*, 1992; Thompson & Thompson, 2002). Laird (1991) após rever várias genealogias da literatura em que homens afetados tiveram filhas normais ou com frequência baixíssima de FRAXA, interpretou este fenômeno de acordo com seu modelo de herança como

uma remoção do *imprinting*. De algum modo, a mutação completa regride para pré-mutação e os espermatozoides dos indivíduos afetados têm apenas a pré-mutação (Reyniers *et al.*, 1993).

Bächner *et al* (1993) estudaram a expressão do *FMRI* em testículos de camundongo e verificaram sinal forte na periferia dos túbulos seminíferos, mas não nas células de Sertoli. Estes túbulos continham poucos espermatozoides maduros e nos túbulos com espermátides e espermatozoides havia pouca expressão. Devys *et al* (1993) encontraram também forte expressão em espermatogônias, sugerindo que além de um papel “*housekeeping*” do *FMRI*, deve haver uma outra função mais específica na proliferação de espermatogônias, o que seria consistente com as observações de que os homens afetados pela SXF só transmitem a pré-mutação a suas filhas. O gene *FMRI* pode ter papel indispensável na espermatogênese. Desse modo, somente as espermatogônias que expressam o gene seriam capazes de concluir este processo, ou seja, células da linhagem germinativa que apresentam a pré-mutação seriam sempre selecionadas.

Evidências sugerem que largas expansões dos triucleotídeos CGG são altamente instáveis no desenvolvimento do espermatozoide. Isto explica que apenas os alelos pré-mutados são encontrados nos espermatozoides de homens com a pré-mutação e com mutação completa (Wittenberger *et al.*, 2007).

Este mecanismo mutacional difere dos já conhecidos, uma vez que a instabilidade criada no DNA pela expansão das seqüências de trinucleotídeos CGG aumenta a probabilidade de ocorrer uma nova expansão na geração seguinte e em sucessivas gerações, constituindo um novo mecanismo mutacional em genes humanos – a mutação dinâmica. De uma forma genérica, as mutações são de natureza estática, ou seja, não exercem influência na probabilidade de recorrência de uma dada mutação nas gerações futuras, ao contrário do que ocorre na SXF. A expansão de trinucleotídeos pode ser devido à um deslizamento da fita de DNA, em função de um erro de emparelhamento durante a replicação graças à presença de um número excessivo de

repetições simples puras, em tandem (Oberlé, 1991; Richards *et al.*, 1992; Kooij *et al.*, 1998).

Mornet *et al* (1993) sugeriram um possível efeito da idade dos afetados sobre o tamanho da mutação completa. Estudaram pares de irmãos afetados e concluíram que o tamanho da amplificação era em média menor nos irmãos mais velhos. Como também encontraram correlação significativa entre os tamanhos das amplificações e a idade materna, havendo transmissão de amplificações maiores pelas mães mais idosas.

Devys *et al* (1992) destacaram que as alterações de metilação decorrentes da mutação do FRAXA já estão estabelecidas muito cedo no embrião (entre 8 a 10 semanas), mesmo quando as ilhas CpG do cromossomo X inativo dos embriões femininos normais ainda estão desmetiladas nas vilosidades coriônicas. Luo *et al* (1993), estudando a ilha CpG do loci *FMR1* concluíram que nos fetos normais, com exceção das vilosidades e gônadas, já ocorre metilação no cromossomo X inativo desde a idade de seis semanas. Nas vilosidades coriônicas de afetados estudadas por Sutherland *et al* (1991), Sutcliffe *et al* (1992) e Yamauchi *et al* (1993), os fragmentos aumentados da mutação completa não estavam completamente metilados. Nos trabalhos de Rousseau *et al* (1991), Devys *et al* (1992) e Suzumori *et al* (1993) não somente a metilação como também a heterogeneidade somática no tamanho dos fragmentos foram observadas já na vilosidades coriônicas.

Wohrle *et al* (1992) estudaram um feto afetado pela SXF e concluíram que a heterogeneidade do tamanho dos fragmentos ocorre em todos os tecidos, mas o padrão pode variar nos diferentes tecidos. Observaram também que nos tecidos com fragmentos desmetilados ocorriam frequências mais baixas de FRAXA.

3. Diagnóstico

Segundo Vianna-Morgante (1999), mesmo na ausência de um tratamento específico, o diagnóstico precoce provê oportunidade para intervenção educativa e terapêutica. A identificação de indivíduos afetados é importante para o aconselhamento genético familiar de membros sob risco de serem portadores da pré-mutação, com medidas de prevenção secundária através do diagnóstico pré-natal, o que reduziria o risco de recorrência com conseqüente diminuição de custos institucionais de saúde pública (Pandey, 2004).

3.1 Citogenética - Expressão do sítio frágil no cromossomo X

Uma das maneiras de se detectar a SXF é identificar o sítio frágil do X ou FRAXA, na região Xq27.3, que é por definição, um ponto específico do cromossomo propenso a quebra. Este sítio é herdado de forma mendeliana dominante ligada ao X, com penetrância incompleta, sendo o gene penetrante em aproximadamente 53% das mulheres e 100% dos homens (Sutherland, 1979a; Rousseau *et al.*, 1991; Mingroni-Netto, 1995; Pandey, 2004).

Essa região cromossômica não sofre condensação normal, provavelmente por uma falha durante sua duplicação, antes do início da mitose que impede o empacotamento do DNA e, conseqüentemente, leva à fragilidade cromossômica observada. A visualização do FRAXA é mais nítida quando se empregam para a cultura de linfócitos meios especiais pobres em folato e com a adição de timidina fria o que favorece a exteriorização do sítio frágil (Sutherland *et al.*, 1985).

Laird (1987) e Laird *et al* (1987) propuseram que o sítio frágil representa uma região de duplicação tardia, de modo que não consegue receber uma sinalização correta para o empacotamento da cromatina. Eventos de metilação poderiam "marcar" estas regiões para manter sua duplicação sempre tardia através de um mecanismo de *imprinting*. Essa duplicação tardia em

Xq27.3 foi, posteriormente, documentada por Yu *et al* (1990) e Webb (1992) em estudos citogenéticos. Por meio da análise molecular, ficou demonstrado por Hansen *et al* (1993) que em homens afetados a região do loco *FMRI* duplica-se em G₂/M, enquanto que em homens portadores da pré-mutação ou normais, a duplicação do loco ocorre principalmente nos períodos S₃ e S₄. A metilação anormal encontrada nos indivíduos retardados, com a SXF reforça a hipótese de Laird *et al* (1987) de que o *imprinting* teria origem desde a ovulogênese nas mães dos afetados. Porém, Migeon (1992) julga improvável que a metilação da ilha CpG se mantenha desde a ovulogênese, já que ondas de desmetilação podem ocorrer no início do desenvolvimento embrionário. Entretanto, Luo *et al* (1993) constataram que a ilha CpG do loco *FMRI* está desmetilada nos oócitos e nas células germinativas masculinas de fetos normais.

Os sítios frágeis não são observados em todas as células do indivíduo afetado, sendo que a frequência com que aparecem é variável, em função do tipo de sítio frágil e de condições da cultura (Sutherland e Ledbetter, 1989; Hecht *et al.*, 1990; Sutherland e Richards, 1999). Homens clinicamente afetados, geralmente, apresentam o sítio frágil (FRAXA) em suas células, porém sua frequência varia entre 10 a 30%, sendo raramente encontrado numa frequência maior que 50% (Lubs, 1969; Sutherland, 1983). Contudo, frequências até 10% ocorrem em 27% dos afetados (Mingroni-Netto, 1988). Por outro lado, mulheres heterozigotas certas, por análise do heredograma, geralmente não expressam o FRAXA ou este é detectado numa frequência muito baixa, principalmente nas mulheres heterozigotas que são fenotipicamente normais, sem comprometimento mental (1 a 4 %). Nas heterozigotas com algum retardo mental essa frequência costuma ser mais alta. Em homens portadores da pré-mutação, sem manifestação clínica, também não manifestam o FRAXA e, portanto, o estudo cromossômico nesses indivíduos é um método de detecção ineficiente. Luo *et al* (1993) demonstraram que a ilha CpG está ainda mais extensivamente metilada nos afetados com FRAXA do que no cromossomo X inativo das

mulheres normais.

Há na literatura descrições ocasionais de famílias com frequência alta de cromossomo X frágil, mas sem anormalidades fenotípicas associadas (Daker *et al.*, 1981; Voelckel *et al.*, 1989; Romain e Chapman, 1992), ou com retardo mental associado, mas sem amplificação detectável com as sondas do loco *FMRI* (Hirst *et al.*, 1991; Nakahori *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Rousseau *et al.*, 1991; Dennis *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1992; Macpherson *et al.*, 1992; Oberlé *et al.*, 1992; Snow *et al.*, 1992; Knobloch *et al.*, 1993). Levantou-se então a hipótese da ocorrência do FRAXA dissociado dos sinais clínicos ou da amplificação da síndrome. Porém, a descrição posterior de mais dois outros sítios frágeis muito próximos ao FRAXA, o FRAXE (Sutherland e Baker, 1992; Flynn *et al.*, 1993) e o FRAXF (Hirst *et al.*, 1993) sugere que essas famílias incomuns são portadoras de outros sítios frágeis, como já foi confirmado em alguns estudos. Knight *et al.* (1993) conseguiram clonar seqüências de DNA do FRAXE, localizado a 600 kb distais ao FRAXA, e demonstraram que existem trinucleotídeos GCC na região em número variável de cópias. Segundo os autores, a ocorrência de retardo mental nas famílias com FRAXE está também vinculada à metilação anormal de uma ilha CpG adjacente, mas as repetições podem se expandir igualmente se herdadas tanto de homem como de mulher. O sítio frágil FRAXE situa-se a nível de Xq28 e, apesar de raro é, do ponto de vista citogenético, indistinguível do FRAXA sendo sua diferenciação deste último somente possível por meio da análise molecular (Sutherland *et al.*, 1993).

Como já dito anteriormente, o exame citogenético apesar de detectar adequadamente os indivíduos afetados, é insatisfatório para estudos familiares, não sendo possível identificar os portadores de pré-mutações, especialmente as mulheres, que apresentam alto risco de gerarem filhos com X frágil.

Além da identificação do sítio frágil pelo exame citogenético existem outros exames que podem ser realizados. O exame imuno-histoquímico permite observar a expressão da proteína FMRP. Os métodos moleculares considerados mais específicos são: reação em cadeia da polimerase (PCR) e o Southern blot (SB), que possibilitam a análise da expansão CGG (Fu *et.*, 1991; Oberlé *et.*, 1991; Yu *et al.*, 1991).

3.2 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica baseia-se na identificação de constituintes celulares, antígenos, através da interação antígeno-anticorpo. A área da interação é identificada através de um anticorpo previamente marcado, que no nosso caso é anti-FMRP e que tem a capacidade de localizar o antígeno desejado, a proteína FMRP. Esse anticorpo primário, monoclonal, é capaz de tornar a reação mais específica, por reagir com um tipo específico de antígeno. Para aumentar a sensibilidade adiciona-se à reação um segundo ac, denominado ac secundário, o qual aumenta os sítios de ligação e conseqüentemente amplifica o sítio de expressão.

A ação da proteína correspondente ao gene *FMR1* é ainda desconhecida, mas sabe-se que é de expressão predominantemente citoplasmática e está presente em muitos tecidos orgânicos. Estudos histoquímicos revelaram que a proteína FMRP é muito abundante em neurônios do sistema nervoso central e periférico, mas quase nenhuma proteína é detectada em células da glia e em tecidos de origem mesodérmica (Devys *et al.*, 1993; Verheij *et al.*, 1993). A hibridação *in situ* revelou marcação preferencial nas camadas granulares do hipocampo e do cerebelo no camundongo adulto (Hinds *et al.*, 1993) e nos neurônios do núcleo basal magnocelular e neurônios piramidais do hipocampo no cérebro fetal, todas estruturas envolvidas no processo de aprendizado (Abitbol *et al.*, 1993).

Com base nesses achados de expressão da proteína FMRP, Willemsen *et al* (1999), descreveram uma nova maneira de se diagnosticar a síndrome do X frágil, por meio da técnica de imuno-histoquímica realizada no bulbo de cabelo, que consiste na análise da expressão da proteína FMRP. Os homens afetados mostram níveis sensivelmente inferiores aos de homens normais, sem sobreposição nos níveis de expressão respectivos. Nas mulheres, a interpretação é mais complicada devido à inativação aleatória de um dos cromossomos X, porém estudos iniciais permitiram diferenciar o nível de expressão da proteína FMRP em bulbos de cabelo de mulheres normais e de afetadas (Ramos-Fuentes, 2001; Willemsen *et al.*, 2003; Soler, *et al.*, 2003).

3.3 Método molecular de investigação - reação em cadeia da polimerase (PCR)

A aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) como método de triagem da SXF é relativamente recente e vem sendo preferida em relação ao método citogenético de pesquisa do sítio frágil X e ao Southern blot. A PCR é considerada uma técnica versátil, rápida, que utiliza pequenas quantidades de DNA, de baixo custo, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade. Portanto, representa o método de escolha para a triagem de indivíduos afetados, em particular do sexo masculino.

Os oligonucleotídeos ou “*primers*” (pequenas seqüências de DNA sintético) empregados na técnica da PCR se ligam ao DNA alvo obedecendo ao princípio de pareamento das bases púricas e pirimidínicas (adenina-timina e citosina-guanina). Dessa forma, permitem amplificar apenas a região específica do genoma a ser estudada (sintetizada), pois se ligam apenas na região onde encontram perfeita homologia das bases púricas e pirimidínicas, A + T e C + G. (Figura 4) (Fu *et al.*, 1991).

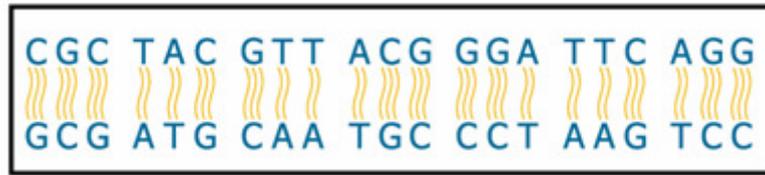


Figura 4 – Pareamento das bases púricas e pirimidínicas do DNA. Fonte: Dantas (2001).

O princípio da PCR baseia-se no processo de duplicação do DNA, usando como molde pequena quantidade de DNA genômico em presença de oligonucleotídeos (*primers*), da enzima Taq DNA polimerase e de deoxinucleotídeos trifosfatados livres (DNTP's). Esses componentes, quando submetidos a ciclos de aquecimento e resfriamento, geram novos fragmentos de DNA semelhantes à molécula molde e em grande quantidade, o que permite a investigação de mutações. As etapas desse processo são representadas pela desnaturação, pareamento e extensão. No termociclador, o DNA alvo é submetido à alta temperatura (95°C) e desnatura-se em duas fitas simples de DNA (fase de desnaturação). Em seguida, ocorre resfriamento (64°C), permitindo que os pares de primers que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, se liguem de forma homóloga a cada uma das fitas do DNA molde (fase de pareamento). Por fim, a temperatura do sistema eleva-se para aproximadamente 72°C, fazendo com que a enzima taq DNA polimerase entre em atividade, permitindo a adição dos nucleotídeos livres e conseqüente formação de uma nova fita de DNA (fase de extensão). Uma vez que os produtos recém-sintetizados também são complementares e capazes de se ligar aos iniciadores, após desnaturação térmica, cada ciclo sucessivo essencialmente dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. A repetição cíclica destas temperaturas por 33 vezes permite a amplificação exponencial de milhares de cópias do DNA alvo sob investigação (Figura 5) (Fu *et al*, 1991; Dantas, 2001).

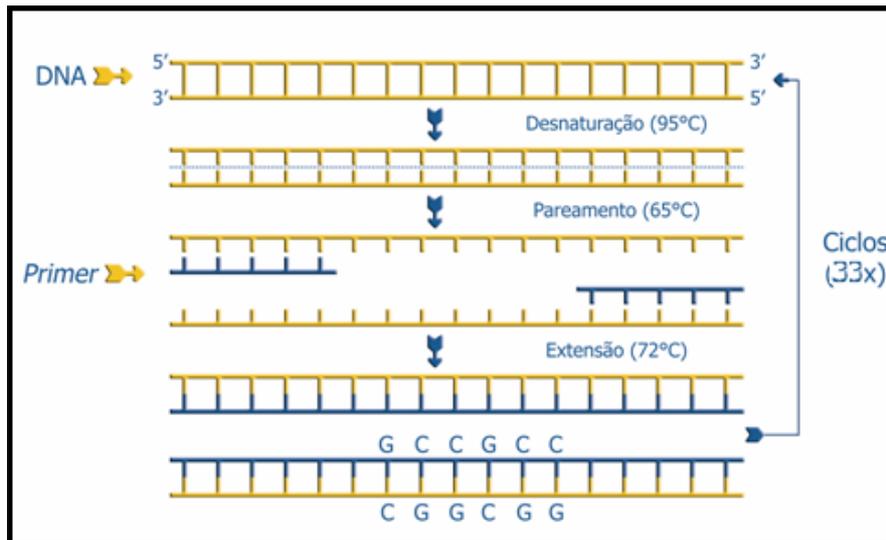


Figura 5 – Ciclos da PCR e suas etapas de desnaturação, pareamento e extensão. Fonte: Dantas (2001).

4. Objetivo

Comparar os três métodos de diagnóstico para síndrome do X frágil: citogenética, imunohistoquímica (bulbo de cabelo) e molecular (PCR) quanto às suas vantagens e limitações.

5. Pacientes e Métodos

5.1 Casuística

O estudo foi realizado em pacientes que foram encaminhados para o Ambulatório de Genética Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A partir das fichas de atendimento, foi possível selecionar todos os pacientes que foram diagnosticados pelo exame citogenético como portadores da síndrome do X frágil. Além disso, foram selecionados alguns casos em que o resultado sugeria a necessidade de exame molecular para melhor acurácia, e ainda alguns casos em que o exame clínico do paciente era fortemente sugestivo da SXF.

Foram obtidas 71 fichas de atendimento de pacientes com sintomatologia compatível e teste citogenético positivo para a SXF. Após repetidas tentativas de contato, tanto telefônico como postal, somente foi possível colher novo material para exame de 47 famílias, correspondendo a um total de 121 pacientes. A coleta das novas amostras foi realizada no Ambulatório de Genética Clínica, do HUB. Foram incluídos na pesquisa indivíduos de ambos os sexos e suas respectivas mães.

O presente trabalho foi aprovado tanto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como também pelo comitê do Hospital Universitário de Brasília.

Previamente à inclusão no protocolo foi fornecido amplo esclarecimento verbal aos pais ou responsáveis pelo paciente salientando objetivos, riscos e benefícios da pesquisa. Após sua concordância em permitir a participação do paciente sob sua responsabilidade no protocolo, foi firmado tanto pela responsável pela pesquisa como pelo responsável direto pelo paciente, consentimento livre e esclarecido em duas vias (em anexo), quedando-se uma das vias em poder do responsável pelo paciente. Adicionalmente os responsáveis pelos pacientes assinaram termo de autorização permitindo a utilização de fotografias para ilustração da pesquisa.

5.2 Aconselhamento genético

Todos os responsáveis pelos pacientes receberam os resultados dos exames realizados, sendo uma cópia também anexada às respectivas fichas de prontuário. Os familiares tanto dos pacientes em que os testes confirmaram o resultado citogenético como daqueles em que o resultado positivo foi obtido pela primeira vez, foram esclarecidos a respeito do diagnóstico e risco de recorrência da doença na família, permitindo a escolha da conduta mais apropriada, com base nos prováveis riscos, nas suas aspirações e em seus padrões éticos e religiosos, sendo-lhe ainda oferecida a possibilidade de continuarem aos cuidados das equipes dos Serviços de Genética Clínica do HUB. Com relação aos pacientes previamente diagnosticados como portadores da SXF pela citogenética, que vieram a apresentar resultados negativos nos exames de imuno-histoquímica e PCR, a família foi esclarecida não serem estes portadores da SXF, provavelmente sofrendo de algum outro tipo de retardo mental.

5.3 Metodologia

Inicialmente foram coletados bulbos de cabelo de diferentes áreas do couro cabeludo dos pacientes. O número de bulbos necessário variava de acordo com o sexo do indivíduo e da qualidade, que quando baixa tinha que aumentar o número da amostra. Nos indivíduos masculinos foram aproximadamente 10 bulbos, enquanto nas mulheres foi necessário aumentar esse número para no mínimo 20 bulbos, em virtude da inativação aleatória de um dos cromossomos X, causando um efeito compensatório benéfico sobre a expressividade do quadro clínico, que poderia gerar um resultado falso negativo.

Esses bulbos coletados foram colocados em uma folha de papel identificada, pois a gordura da raiz permitia que o bulbo aderisse ao papel, onde em seguida essa folha foi guardada

em saco plástico (*zipper bags*). Esses bulbos foram posteriormente cortados, colocados em eppendorfs de 0,5mL, identificados (pelo nome, iniciais, registro familiar e data) e armazenados em freezer a -70°.

Foram colhidos 10mL de sangue com EDTA para exame molecular, e em alguns casos onde não havia sido realizado exame citogenético foi colhido 4mL de sangue com heparina para citogenética.

5.4 Técnicas realizadas

5.4.1 Citogenética

5.4.1.1 Obtenção de metáfases a partir da cultura de leucócitos

(Moorehead *et al.*, 1960, com modificações)

As análises cromossômicas de cultura de linfócitos foram realizadas a partir de metáfases obtidas de cultura temporária de linfócitos de sangue periférico, utilizando-se bloqueio da mitose em metáfase com colchicina *in vitro*.

De cada paciente foram obtidos aproximadamente 4 mL de sangue periférico, heparinizado. Essa amostra foi mantida em duas garrafas de cultivo estéreis, onde era semeado 1 mL de sangue para cada garrafa com 9 mL de meio RPMI, previamente filtrado, acrescidos de penicilina e estreptomicina (100 U/mL) e 15% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C em atmosfera úmida. As culturas foram cultivadas por 96 horas em estufa úmida a 37°C. Após as 72 horas de cultivo celular, acrescentaram-se 300µL timidina (15mg/mL), substância que induz a manifestação do sítio frágil.

Para a realização dos procedimentos, acrescentaram-se 280µL de colchicina (0,16 µg/10mL) em cada garrafa de cultura, substância que despolimeriza a tubulina do fuso mitótico com bloqueio das mitoses em metáfase, deixando-a atuar por 40 minutos. Após o período de ação da colchicina o material foi transferido para quatro tubos de fundo cônico (falcon), com capacidade para 15 mL, e centrifugado por cinco minutos a 1000 rpm (Centrífuga Internacional, modelo K, tamanho 2, rotor nº 250, não refrigerada). O sobrenadante foi então desprezado e adicionaram-se ao pélete 14 mL de solução hipotônica KCl 0,075 M previamente aquecida a 37°C, a qual provoca intumescência e espalhamento dos cromossomos, seguida por

homogeneização com auxílio de pipeta Pasteur. Após a homogeneização os tubos foram para estufa a 37°C por 15 minutos. Logo após, os tubos foram submetidos à nova centrifugação a 1000 rpm durante sete minutos. Terminada a centrifugação cerca de 8 mL do sobrenadante foi desprezado e com a utilização do vórtex foi acrescido 7 mL de fixador, constituído de uma solução de metanol e ácido acético glacial na proporção de 3 para 1, o qual fixa as metáfases e lava os restos celulares. Os tubos foram novamente centrifugados por cinco minutos, o sobrenadante desprezado e 7 mL de fixador acrescido. O último procedimento foi repetido por mais três vezes e ao término cerca de 1,0 mL de fixador, variando de acordo com o volume do pélete, foi utilizado a fim de suspender as células para o preparo das lâminas.

5.4.1.2 Preparo e Coloração das Lâminas

As lâminas utilizadas foram limpas com solução saturada de KOH, diluída em álcool comercial, onde permaneciam por 24 horas antes de serem lavadas em água corrente e depois armazenadas em água destilada em geladeira na temperatura de 4 a 6°C. No momento do uso, as lâminas foram posicionadas ligeiramente inclinadas e uma gota da suspensão de células era então colocada sobre a lâmina com ajuda de pipeta Pasteur. O excesso de água foi retirado com papel absorvente e a primeira lâmina foi flambada com auxílio de uma lamparina de álcool a fim de se observar a concentração do material e a qualidade das metáfases, e mais dez lâminas foram preparadas e guardadas. Essas lâminas que não foram flambadas foram submetidas ao processo de “envelhecimento” (desidratação), colocadas em uma estufa seca, a 50°C durante 24 horas. Todas as lâminas foram identificadas para posterior análise.

A coloração foi feita com a utilização da solução de Giemsa, corante químico que se liga ao DNA, diluído em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 (Fosfato dibásico de sódio Na₂HPO₄ e

Fosfato monobásico de potássio KH_2PO_4) na proporção de 1 para 30, durante cinco minutos.

As lâminas desidratadas passaram por um processo de bandamento G, técnica de coloração dos cromossomos para produzir padrões específicos de bandas heterocromáticas escuras (bandas G) e eucromáticas claras alternadas (G - negativas). Cada lâmina foi inicialmente colocada em uma cubeta de plástico, contendo 50 mL de tampão HBSS (*Hanks Balance Salt Solution*) e 100 μL de tripsina, 2,5% a 37°C, solução que irá submeter os cromossomos a uma digestão controlada, durante um tempo variável de 15 a 25 segundos. Após serem retiradas do frasco com tripsina, as lâminas foram mergulhadas em frasco contendo apenas HBSS (50 mL), retiradas, e em seguida mergulhadas em um terceiro frasco contendo 50 mL de HBSS e 1 mL de soro fetal bovino, e finalmente, mergulhadas em um quarto frasco contendo apenas HBSS, retiradas e submetidas à coloração com Giemsa nas mesmas proporções já descritas (Seabright, 1971).

5.4.1.3 Análise Citogenética

A análise citogenética constituiu em procurar as metáfases ao microscópio, contá-las e identificar se existe alguma fragilidade na porção subterminal do cromossomo X. Para análise utilizou-se microscópio óptico, com objetiva de imersão com aumento de 100x e ocular de 10x, totalizando um aumento de 1000x.

A descrição do cariótipo segue regras precisas estabelecidas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 1995). Um cariótipo normal é designado 46,XX ou 46,XY. A fragilidade no cromossomo X é designada pela letra minúscula “fra” seguida, entre parênteses, do cromossomo envolvido e novamente entre parênteses o braço e a banda do cromossomo respectivamente, ex: 46,X,fra(X)(q27.3).

Foi considerado X frágil positivo quando se encontrou a mesma anormalidade estrutural em pelo menos 3 metáfases em 100 analisadas, em indivíduos do sexo masculino (Webb *et al.*, 1986). Em relação às mulheres, é evidente que o estudo cromossômico é inconclusivo nos casos com frequências de até 3% (Mingroni- Netto *et al.*, 1995), por isso foi considerado nessa amostra como ponto de corte frequências superiores a 4%.

5.4.2 Imuno-histoquímica

5.4.2.1 Detecção da expressão da proteína FMRP em bulbo de cabelo

(Willemsen *et al.*, 1999, com modificações)

Foi utilizada nessa pesquisa a técnica de fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP), onde o primeiro passo consistiu na fixação dos bulbos de cabelo com paraformaldeído 3% durante 10 min, a fim de preservar toda morfologia do tecido. Em seguida, as células foram permeabilizadas com a solução de metanol/H₂O₂ a 30% durante 30 min, a qual bloqueia a atividade da peroxidase endógena e consequentemente impede que o sítio antigênico seja danificado. Os bulbos foram lavados com PBS. Acrescentou-se uma solução de PBS/albumina bovina sérica (BSA) 3%/glicina 1,5% durante 20 min, que atua no bloqueio dos antígenos inespecíficos, por competir com os sítios de ligação, evitando assim, ligações inespecíficas. Logo após, os bulbos de cabelo foram incubados com anticorpo primário monoclonal anti-FMRP (*Mouse Anti-Fragile X Mental Retardation Protein FMRP* - CHEMICON[®]) (titulação 1:2000) em geladeira à 4°C por uma noite, permitindo sua ligação específica ao antígeno de interesse, a proteína FMRP.

Após 24 horas, as amostras foram retiradas da geladeira e deixadas por 15 min à temperatura ambiente para dar início à segunda etapa do procedimento. Os bulbos foram inicialmente lavados com Tris 0,1M e em seguida incubados com Anticorpo secundário biotilado (*Link Goat Anti-Mouse Immunoglobulins. Swine Anti- Rabbit Immunoglobulins* - .DAKO[®]) em banho-maria à 37°C durante 15 min, a fim de aumentarem os sítios de ligação (4 em vez de 1) e consequentemente amplificar o sinal de expressão. Depois de serem lavados com Tris 0,1M, foram novamente incubados, sendo que agora com o complexo APAAP (*Immune Complex APAAP - Alkaline Phosphatase- Antialkaline Phosphatase* - DAKO[®]) em banho-maria

à 37°C durante 15 min. Este complexo reconhece o anticorpo secundário e amplifica o número de moléculas de fosfatases que irão se prender ao antígeno, ampliando a revelação do sinal e tornando este método muito mais sensível. Após a lavagem com Tris 0,1M, a reação foi revelada pelo cromógeno vermelho rápido “Fast Red” (2mL do tampão de substrato : 1 tablete de Fast red - DAKO®) durante 15 a 20 min, o qual promove a visualização dos complexos antígeno-anticorpo (essa solução deve ser preparada e filtrada na hora para que não sofra precipitação). Terminada a revelação faz-se a última lavagem com Tris 0,1M para posterior montagem das lâminas. As lâminas foram identificadas e montadas com ultramont (DAKO®), e depois de secas, os bulbos foram enumerados para evitar que fossem analisados mais de uma vez (Figura 6).

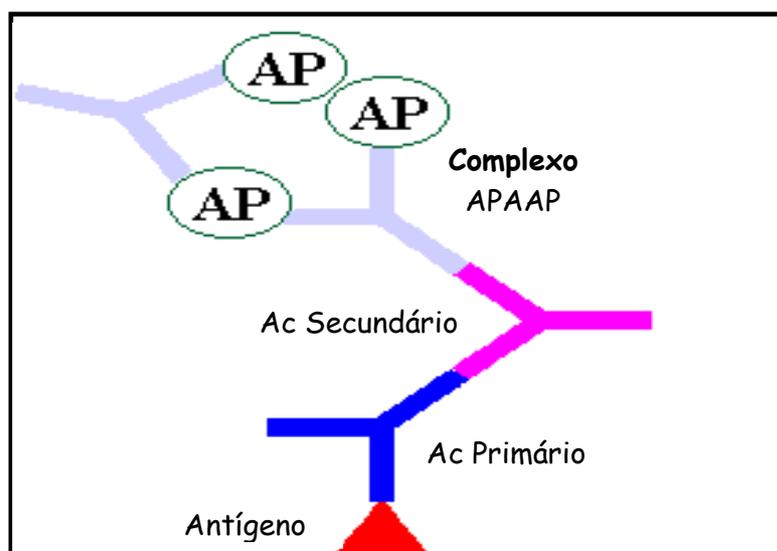


Figura 6 – Esquema da interação antígeno-anticorpo por meio da técnica de fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina. Fonte: www.dakocytovision.com, acessado em 12/05/2007 com modificações.

Para controle negativo, alguns bulbos foram incubados com PBS em substituição do anticorpo primário; e para controle positivo foram utilizados bulbos de pacientes positivos que sabidamente não iriam expressar a proteína FMRP.

5.4.2.2 Critérios de análise do bulbo de cabelo

O diagnóstico é feito pela coloração avermelhada quando a proteína FMRP for expressa no bulbo de cabelo. Inúmeras variáveis como: qualidade do bulbo, integridade, espessura da bainha e cabelos muito escuros, podem influenciar o resultado.

Uma análise semiquantitativa dos bulbos de cabelo foi executada e classificada em cruces, variando de zero a quatro cruces, dependendo da intensidade e do tamanho da área de expressão (coloração) da proteína FMRP, de acordo com os seguintes parâmetros: (-) ausente; (+) leve; (++) moderada; (+++) intensa; (++++) muito intensa. Indivíduos normais deveriam apresentar alta expressão da proteína, em torno de 3 a 4 cruces, enquanto que afetados, teriam ausência da proteína FMRP e conseqüentemente baixa ou nenhuma expressão da mesma, ficando em torno de 0 a 2 cruces, o que é característico da síndrome do X frágil.

Para a análise dos resultados utilizou-se microscópio óptico com ocular de 10x com duplo canhão executada simultaneamente por dois observadores, em teste cego. A avaliação semiquantitativa da coloração apresentada pelos bulbos capilares era assinalada somente quando houvesse concordância entre os observadores.

Foi estabelecido como ponto de corte a menor percentagem de expressão em indivíduo controle da proteína FMRP, que neste caso foi de 75%. Assim, com 75% de expressão da proteína o indivíduo foi caracterizado como normal. Os portadores da SXF apresentaram expressão muito baixa ou ausente, próxima à zero. As percentagens dos resultados foram obtidas de acordo com a classificação em cruces (zero a 4) divididas pelo número de bulbos de cabelo analisados.

5.4.3 Molecular (PCR)

5.4.3.1 Extração de DNA a partir de linfócitos

(Miller *et al.*, 1988, com modificações)

Foram coletados 10mL de sangue periférico em tubos para coleta a vácuo com EDTA (50µL EDTA (K₃) a 15%). A cada amostra foram adicionados 35mL de uma solução de lise de hemácias 1x (NH₄Cl 1550mM; KHCO₃ 100mM; EDTA 10mM; pH 7.4) em tubos de fundo cônico de 50mL (falcon). As amostras foram homogeneizadas e deixadas em banho de gelo durante 30 minutos para obtenção de lise das hemácias, e centrifugadas por 10 minutos a 4°C e a 1800 rpm. O sobrenadante foi descartado e repetido o mesmo procedimento mais uma vez para garantir a completa lise de hemácias. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 3mL de solução de lise de núcleos 1x (Tris-HCl 100mM; NaCl 4M; EDTA 20mM pH 8.2), a fim de lisar os núcleos e degradar as proteínas; acrescido de proteinase K na concentração de 10mg/mL, que irá aumentar a eficiência do dodecil sulfato de sódio (SDS) na dissociação das proteínas dos ácidos nucléicos; e por fim SDS 20%, que atua como detergente, dissociando as proteínas dos ácidos nucléicos, dissolvendo os lipídeos de membrana e inibindo a ação de nucleases. As amostras foram misturadas delicadamente com movimentos rotatórios e incubadas em banho-maria à 37°C por uma noite (solução deve se apresentar límpida e viscosa).

No dia seguinte foi adicionado 1mL de NaCl 6M e os tubos agitados vigorosamente no vórtex por 30 segundos e em seguida, centrifugados por 15 minutos à 25 °C e a 2500 rpm. O NaCl em altas concentrações iônicas desnatura as proteínas e as precipita. Essa etapa é fundamental para separar o DNA das proteínas. Quando da presença de sobrenadante turvo foi este transferido para um tubo falcon limpo, agitado no vórtex e centrifugado novamente sem

adicionar mais NaCl. Esta etapa foi sempre repetida para garantir um DNA mais puro. Após a última centrifugação o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e o DNA foi precipitado adicionando-se dois volumes de etanol absoluto e invertendo-se o tubo, permitindo assim, a retirada das moléculas de água devido a sua competição com as pontes de hidrogênio da água, provocando uma compactação do DNA. O DNA foi então capturado em um capilar de vidro, lavado em etanol 70%, a fim de retirar o excesso de sal, e dissolvido em 600-800µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0 e EDTA 1mM pH 8.0) e armazenados em eppendorf. A seguir as amostras foram colocadas em uma placa aquecedora a 65°C durante 30 minutos, proporcionando a inativação de enzimas e proteínas, e posteriormente guardadas em geladeira.

5.4.3.2 Estimativa da concentração do DNA nas amostras

A concentração de DNA das amostras foi estimada por meio do espectrofotômetro, a partir do valor da absorbância a 260nm previamente zerado com o branco (TE). Foi, então, diluído em uma concentração de 1 para 100 de TE. O cálculo da concentração em µg/µL foi obtido da seguinte maneira:

$$\text{Abs (260nm)} \times 50 \text{ O.D.} \times \text{fator de diluição (100)} / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Onde O.D. significa densidade ótica do DNA de fita dupla. A leitura da proteína é realizada a 280nm e a relação DNA/Proteína (A_{260} / A_{280}) fornece um parâmetro de avaliação da pureza das preparações de ácidos nucleicos, onde a razão ótima é entre 1.8-2. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína; e valores acima de 2 resultam de contaminação com RNA.

5.4.3.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A reação em cadeia da polimerase foi realizada segundo Gérard *et al* (1997), com modificações. Foram empregados aproximadamente 50ng do DNA genômico por reação (Figura 7). O reagente da PCR foi preparado contendo 20pmoles de cada primer que funcionará como iniciadores da reação (primer C: 5'GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT 3'; primer F: 5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA 3'). Outro par de primers que funcionará como controle interno da reação (gene da enzima Metileno tetra-hidrofolato redutase) (Primer MTHFR F: 5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'; Primer MTHFR R: 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3') diluídos em tampão 10x da Taq Platinum (Tris-HCl 50,25mmol/L, pH 8,8; (NH₄)₂SO₄ 1M; MgCl₂ 2mmol/L; BSA 127,5µg/mL); 200µmol/l dos nucleotídeos dATP, dTTP, dCTP; 150µmol/L do dGTP; 50µmol/l do 7-deaza-2'dGTP, dimetilsulfoxido à 10% (Quadro 1) e 2,5U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen) no volume final de 25µl (Quadro 2). Realizou-se um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 33 ciclos de amplificação (95°C, 1 minuto; 64 °C, 1,5 minutos e 72°C, 2 minutos) e extensão final de 72°C, 5 minutos (Quadro 3). Do produto da PCR, 12µl foram submetidos à eletroforese 70 volts por aproximadamente 3 horas, em gel de agarose à 2,5% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio.

| Nucleotídeos (estoque) | Concentração por reação | Volume à pipetar |
|------------------------|-------------------------|------------------|
| dATP (100mM) | 200 µmol/L | 8µL |
| dTTP (100mM) | 200 µmol/L | 8µL |
| dCTP (100mM) | 200 µmol/L | 8µL |
| dGTP (100mM) | 150 µmol/L | 6µL |
| Deaza dGTP (5mM) | 50 µmol/L | 40µL |

Quadro 1 - Nucleotídeos (dNTP's) e suas respectivas concentrações e volume.

| <u>Amostra</u> | <u>Controle (-) da reação</u> |
|---|--|
|  |  |
| 4 μ L H ₂ O milli Q + 1 μ L DNA + 20 μ L mix com enzima. | 5 μ L H ₂ O milli Q + 20 μ L mix com enzima |

Figura 7 – Preparo dos tubos da PCR mostrando as soluções utilizadas.

| Mix Taq Platinum | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Reagentes: | 1 Reação |
| H ₂ O | 9.51 μ L |
| DMSO 100% | 2,5 μ L |
| Tampão 10x | 2,5 μ L |
| MgCl ₂ 50mM | 0,75 μ L |
| dNTPs (10mM cada) | 0,44 μ L |
| Primer C (20pmoles/ μ L) | 1 μ L |
| Primer F (20pmoles/ μ L) | 1 μ L |
| Primer MTHFR F (20pmoles/ μ L) | 1 μ L |
| Primer MTHFR R (20pmoles/ μ L) | 1 μ L |
| Enzima Taq Platinum (5U/ μ L) | 0.3 μ L |
| TOTAL | 20 μL |

Quadro 2 - Reação MIX utilizada no preparo da PCR.

| Temperatura | Tempo | N° de ciclos |
|-------------|----------|--------------|
| 95°C | 10' | - |
| 95°C | 1' | } 33 |
| 64°C | 1,5' | |
| 72°C | 2' | |
| 72°C | 5' | - |
| 4°C | ∞ | - |

Quadro 3 – Programa dos ciclos da PCR

5.4.3.4 Aplicação das amostras da PCR no gel

Devem ser aplicados no primeiro poço do gel de agarose 5µl do marcador molecular que servirá como referência para a confirmação das bandas da amostra amplificada. O marcador utilizado nos géis foi de 100pb, em razão da banda de interesse ser em torno de 300pb.

Foram aplicados 2µl de tampão de amostra 10x (azul de bromofenol) com 12µl do produto de PCR em cada poço do gel de agarose. O tampão de amostra foi usado com dois propósitos: a) como agente espessante de alta densidade (glicerol), evitando o refluxo da amostra de DNA ao ser aplicada no poço do gel; b) como corante permitindo o acompanhamento da frente de corrida. O azul de bromofenol migra concomitantemente com os fragmentos lineares de 300pb, enquanto xileno cianol migra com a mesma velocidade dos fragmentos lineares de cerca de 4kb. No caso presente o que melhor se adequou foi o azul de bromofenol, porque o xileno cianol apresentou uma mancha bem em cima das bandas de interesse. Já na diluição do marcador molecular foi colocada a mistura dos dois tampões de amostra.

5.4.3.5 Concentração do gel de agarose

Os géis foram feitos de agarose a 2,5%. Essa alta concentração desempenha importante papel na resolução do fragmento amplificado, em especial nos casos de mulheres heterozigotas normais, onde é imprescindível que os dois alelos do cromossomo X fiquem distintos.

A molécula de DNA possui carga negativa em pH neutro ou alcalino e quando é aplicada ao gel e submetida a um campo elétrico, essa macromolécula migrará em direção ao anodo, ou seja, pólo positivo.

A migração do DNA e a qualidade do resultado de uma eletroforese são afetadas pelo tamanho da molécula, concentração do gel, concentração e força iônica do tampão de corrida e voltagem aplicada.

5.4.3.6 Registro dos géis

Todos os géis foram fotografados para registro das amostras. Esse procedimento deve ser realizado rapidamente para que as bandas não percam a intensidade da fluorescência e a fim de minimizar o contato com a luz UV do transiluminador, que é altamente mutagênica.

5.4.3.7 Critérios de avaliação do Exame Molecular (PCR)

Os resultados obtidos por este método ocorrem de forma indireta, ou seja, a presença da mutação completa impossibilita a amplificação e a conseqüente observação dos alelos *FMRI* mutados. Em amostras de indivíduos do sexo masculino, a amplificação do sinal de seu único alelo de aproximadamente 300pb por meio da PCR permite descartar o diagnóstico (são negativos para a SXF), enquanto que a ausência de amplificação o confirma (Pierreti *et al.*, 1991).

No caso de mulheres, a triagem da SXF pela PCR torna-se difícil por haver a chance destas serem homozigotas ou heterozigotas. Elas possuem dois cromossomos X, ambos com a presença da região polimórfica CGG do gene *FMRI*. A análise da PCR de mulheres homozigotas normais se apresenta com apenas uma banda, onde os dois alelos estão sobrepostos, pois o seu par de alelos é de igual tamanho (em torno de 300pb). As heterozigotas afetadas com um alelo normal e o outro alelo expandido (mutado) também apresentam apenas uma banda,

correspondente ao alelo normal (de aproximadamente 300pb), visto que o alelo mutado não é amplificável. Essas situações impossibilitam distinguir, por meio da reação da PCR, mulheres homozigotas normais de heterozigotas com um alelo mutado, não amplificável, tornando o resultado da PCR, nessas duas condições, inconclusivo. Já mulheres heterozigotas normais, por outro lado, permitem a amplificação dos seus 2 alelos (2 bandas) de tamanhos diferentes, porém normais, o que possibilita considerá-las negativas à PCR. Entretanto essa frequência é realmente muita baixa na população.

Vale a pena ressaltar que este método (PCR) é empregado como triagem para a síndrome do X frágil e que em caso de resultados inconclusivos, deverão ser confirmados pela técnica de Southern blot.

Até pouco tempo atrás era necessário confirmar os casos positivos da SXF (caracterizados pela ausência de amplificação) em indivíduos do sexo masculino pelo Southern blot, porque não ocorrendo amplificação do gene *FMRI*, não era possível determinar se a ausência da amplificação era realmente característica da SXF ou se era devido à falha na reação. Com intuito de evitar essa insegurança no diagnóstico e ter que posteriormente confirmá-lo pelo Southern blot foi utilizado um controle interno na reação da PCR para permitir a amplificação de um fragmento controle, sendo agora possível identificar a amplificação de dois fragmentos (duas bandas) nos indivíduos normais, uma correspondendo ao gene *FMRI* e a outra ao gene do controle interno, que não tem nenhuma correlação com a SXF. Dessa maneira, nos casos positivos para SXF ocorrerá apenas a amplificação do controle interno, excluindo assim, possíveis falhas na reação da PCR (Fu *et al.*, 1991).

Foi utilizado como controle interno da reação o gene da enzima Metileno Tetra-Hidro Folato Redutase (MTHFR), o qual permite a amplificação de um fragmento em aproximadamente 200pb, não sobrepondo com as bandas de interesse que ficam em torno de 300pb. Esse gene,

basicamente, está relacionado a doenças vasculares e cardíacas, em razão da sua deficiência no processo de metilação (Van der Put *et al.*, 1995; Melo *et al.*, 2006).

A PCR representa o melhor método de triagem molecular da mutação CGG. Seu emprego permite confirmar resultados obtidos pelas técnicas de imuno-histoquímica e citogenética. A PCR será considerada como o método de referência na validação das técnicas já descritas, possibilitando, desta forma, o cálculo das propriedades estáveis (sensibilidade e especificidade), dos valores preditivo positivos e negativos e da acurácia (exatidão) do teste do bulbo de cabelo.

5.5 Cálculo das propriedades estáveis

O cálculo das propriedades estáveis (sensibilidade e especificidade), dos valores preditivos positivos e negativos e da acurácia das técnicas de imuno-histoquímica e citogenética nos pacientes do sexo masculino, tendo como padrão-ouro a técnica de PCR, foi obtido segundo as seguintes fórmulas (Pereira, 1995; Soares *et al.*, 1999):

$$\text{Sensibilidade} = (a/a+c) \times 100$$

$$\text{Especificidade} = (d/ b+d) \times 100$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = (a/a+b) \times 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = (d/c+d) \times 100$$

$$\text{Acurácia (exatidão)} = [(a+d) / (a+b+c+d) \times 100$$

Onde:

a = Verdadeiros positivos

b = Falso-positivos

c = Falso-negativos

d = Verdadeiros negativos

Para realização dos cálculos do intervalo de confiança (IC95%), foi utilizada a seguinte fórmula (Pereira, 1995):

$$P \pm 2 \sqrt{p.q / n}$$

Onde:

p = prevalência

q = 1- p

n = n° da amostra

6. Resultados

O número amostral correspondeu ao número de conveniência representado por todos os pacientes encaminhados ao laboratório com suspeita da SXF. Foi possível alcançar um número amostral de 121 pacientes que realizaram pelo menos uma técnica de diagnóstico para a SXF. A menor idade observada entre os pacientes do sexo masculino foi de 4 e a maior de 32 anos (média de 13 anos, mediana de 12 anos) enquanto no sexo feminino a menor idade foi de 8 e a maior de 57 anos (média de 33 anos, mediana de 35 anos). Os pacientes do sexo feminino representaram 51,2% da amostra. Esse aumento se deve à inclusão das mães de afetados na pesquisa (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequências absoluta e relativa da população estudada segundo o sexo, Brasília, 2006-2007.

| Sexo | Frequências | |
|-----------|-------------|--------------|
| | Absoluta | Relativa (%) |
| Masculino | 59 | 48,8 |
| Feminino | 62 | 51,2 |
| TOTAL | 121 | 100 |

Dentre os 121 pacientes estudados, 104 realizaram o exame citogenético; 113 o exame imuno-histoquímico; 119 o exame molecular (PCR). Para controle negativo da reação de imuno-histoquímica foram obtidos 90 indivíduos normais (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição da população estudada segundo o sexo e os exames realizados, Brasília, 2006-2007.

| Sexo | Frequência Absoluta | | | |
|-----------|---------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Controle (-) | Citogenética | Imuno-histoquímica | Molecular - PCR |
| Masculino | 58 | 57 | 54 | 57 |
| Feminino | 32 | 47 | 59 | 62 |
| Total | 90 | 104 | 113 | 119 |

6.1 Resultados da Citogenética

Foram diagnosticados pela citogenética 104 casos, onde 57 representaram os indivíduos do sexo masculino, desses: 34 apresentaram resultados positivos e 23 foram negativos. Já as mulheres representaram 47 casos, onde 27 obtiveram resultados positivos e 20 foram negativos (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da citogenética segundo o sexo, Brasília, 2006-2007.

| SEXO | Citogenética | | TOTAL |
|-----------|--------------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Masculino | 34 | 23 | 57 |
| Feminino | 27 | 20 | 47 |

Os pacientes submetidos ao exame citogenético com técnica de bandamento G mostraram-se 58,6% positivos para SXF (61/104). A tabela 5 relaciona a frequência de células que expressam o sítio frágil nos casos analisados como positivos: nos 34 homens, a menor expressão do sítio frágil detectada foi 3% enquanto a maior foi de 36%; já nas 27 mulheres, o nível de expressão variou de 5,4% a 37,1%. Porém, houve duas pacientes que apresentaram 2% e 2,8% de FRAXA. Estas foram retiradas da amostra de pacientes positivas, devido ao baixo percentual encontrado sendo, portanto, consideradas negativas para SXF. Conseqüentemente, a menor percentagem observada passou a ser 5,4% de FRAXA. Frequências inferiores a 10% ocorreram em 32,3% dos homens e 26% das mulheres, enquanto frequências superiores ou iguais a 10% ocorreram em 67,7% dos homens e 74% das mulheres.

Tabela 5 – Portadores da SXF com a menor e maior percentagem de células que expressaram o sítio frágil, juntamente com a frequência de <10% ou ≥10% que ocorreram nos indivíduos afetados, Brasília, 2006-2007.

| SEXO | Expressão do sítio frágil | | Frequências | |
|-----------|---------------------------|-------|-------------|------|
| | Menor | Maior | <10% | ≥10% |
| Masculino | 3% | 36% | 32,3 | 67,7 |
| Feminino | 5,4% | 37,1% | 26 | 74 |

A visualização se dá como uma constrição pouco corada em uma ou ambas as cromátides de um cromossomo metafásico, próximo à extremidade do braço longo do cromossomo X conforme indicado na figura 8.



Figura 8 – Visualização do sítio frágil numa metáfase obtida de cultura de linfócitos. Fonte: Laboratório de Genética Clínica – Faculdade de Medicina (UnB), Brasília, 2006-2007.

6.2 A prevalência de polimorfismos entre os pacientes suspeitos da SXF

Entre as alterações cromossômicas encontradas pela análise citogenética de bandamento G, foram observadas 1,9% de polimorfismos nos pacientes suspeitos da SXF. Foram detectados dois tipos de polimorfismos cromossômicos (2/104) com os seguintes resultados: 46,XY,9qh+; 46,Y, fra(X)(q27.3),16qh+.

Em relação ao aumento da heterocromatina observada nos cromossomos 9 e 16, foram encontradas em dois indivíduos do sexo masculino. Nos dois casos as técnicas de imuno-histoquímica e PCR foram negativas, porém no segundo (16qh+), ainda foi observada fragilidade cromossômica em 3% das células analisadas.

6.3 Resultados da Imuno-histoquímica

Após o consentimento informado, os bulbos de cabelo foram coletados de 113 pacientes (54 homens e 59 mulheres), e de 90 indivíduos sadios (58 homens e 32 mulheres) que foram usados como grupo controle.

Nos 54 pacientes do sexo masculino analisados pela imuno-histoquímica, foram observados 17 resultados positivos, 28 resultados negativos, nove resultados inconclusivos. Como já descrito anteriormente, o ponto de corte estabelecido pela expressão da proteína FMRP para indivíduos normais foi de 75-100%, enquanto os indivíduos afetados apresentaram ausência ou baixa expressão da proteína FMRP ficando em torno de 0-6,2% de expressão. Entretanto, não foi possível classificar alguns pacientes nas categorias acima, sendo os resultados que variaram de 28-70% de expressão da FMRP considerados inconclusivos. Em relação às 59 mulheres, foram analisados sete resultados positivos, 27 resultados negativos e 25 resultados inconclusivos. Porém nas mulheres os resultados positivos considerados variaram de 0-22% de expressão da

proteína FMRP, enquanto nos resultados inconclusivos, a variação observada foi de 30-74% de expressão da proteína FMRP (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da imuno-histoquímica segundo o sexo, Brasília, 2006-2007.

| SEXO | Imuno-histoquímica | | | TOTAL |
|-----------|--------------------|----------|--------------|-------|
| | Positivo | Negativo | Inconclusivo | |
| Masculino | 17 | 28 | 9 | 54 |
| Feminino | 7 | 27 | 25 | 59 |

Em indivíduos normais a presença da proteína FMRP resultará em coloração avermelhada no bulbo de cabelo. Os afetados, por não possuírem a proteína FMRP, apresentarão cor esbranquiçada no bulbo de cabelo (Figura 9).

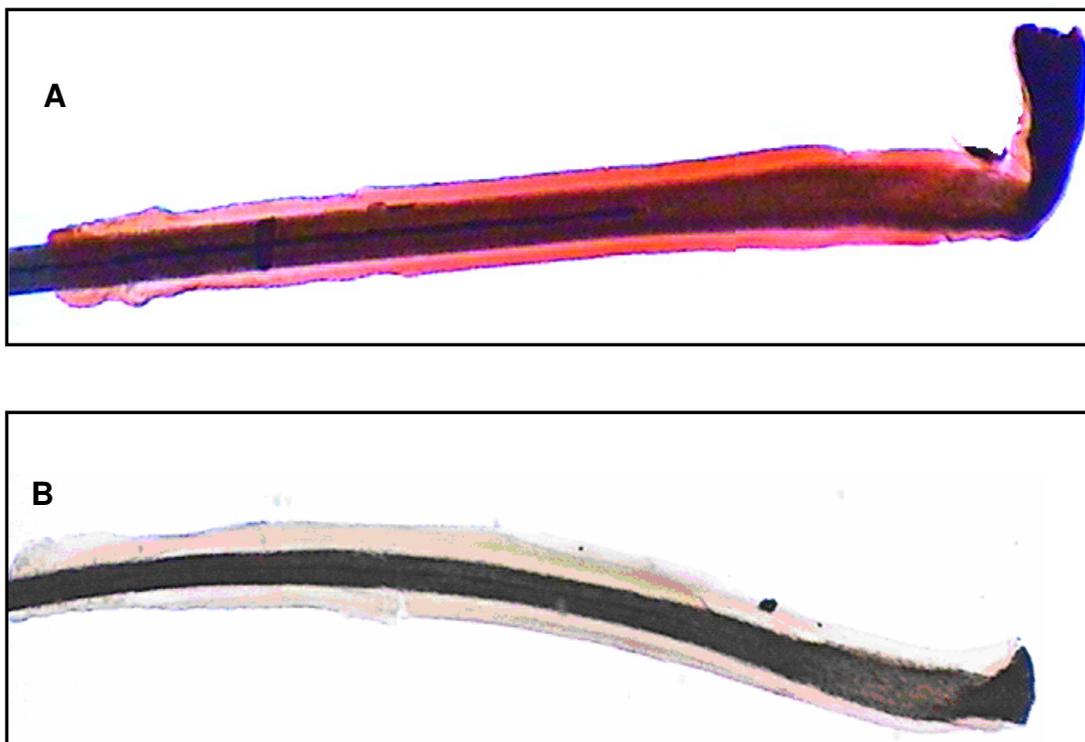


Figura 9 – Expressão da proteína FMRP em bulbo de cabelo por meio da técnica de fosfatase alcalina indireta. Imagem A – corresponde a um indivíduo controle (alta expressão da proteína FMRP); Imagem B - representa um indivíduo afetado (ausência da expressão). Fonte: Laboratório de Imunopatologia – Faculdade de Medicina (UnB), Brasília, 2006-2007.

6.4 Resultados da PCR

Dentre 119 amostras de DNA analisadas pela PCR, foram detectados 20 resultados positivos (16,8%), 40 negativos (33,6%) e 59 inconclusivos (49,6%). Estas 59 amostras inconclusivas foram provenientes de pacientes do sexo feminino. As demais amostras de pacientes do sexo feminino (3/62) mostraram-se heterozigotas normais (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da PCR segundo o sexo, Brasília, 2006-2007.

| SEXO | PCR | | | TOTAL |
|-----------|----------|----------|--------------|-------|
| | Positivo | Negativo | Inconclusivo | |
| Masculino | 20 | 37 | - | 57 |
| Feminino | - | 3 | 59 | 62 |

Os resultados obtidos das amostras de DNA de 14 indivíduos pela reação da PCR estão apresentados na figura 10. É possível verificar que de oito amostras de indivíduos do sexo feminino, apenas duas apresentaram amplificação de dois alelos. Esta informação permite considerá-las heterozigotas normais. No entanto, as outras seis amostras do sexo feminino foram consideradas inconclusivas por apresentarem apenas uma amplificação. No caso dos seis indivíduos do sexo masculino, três foram negativos para a SXF enquanto os outros três foram positivos pela ausência da amplificação.

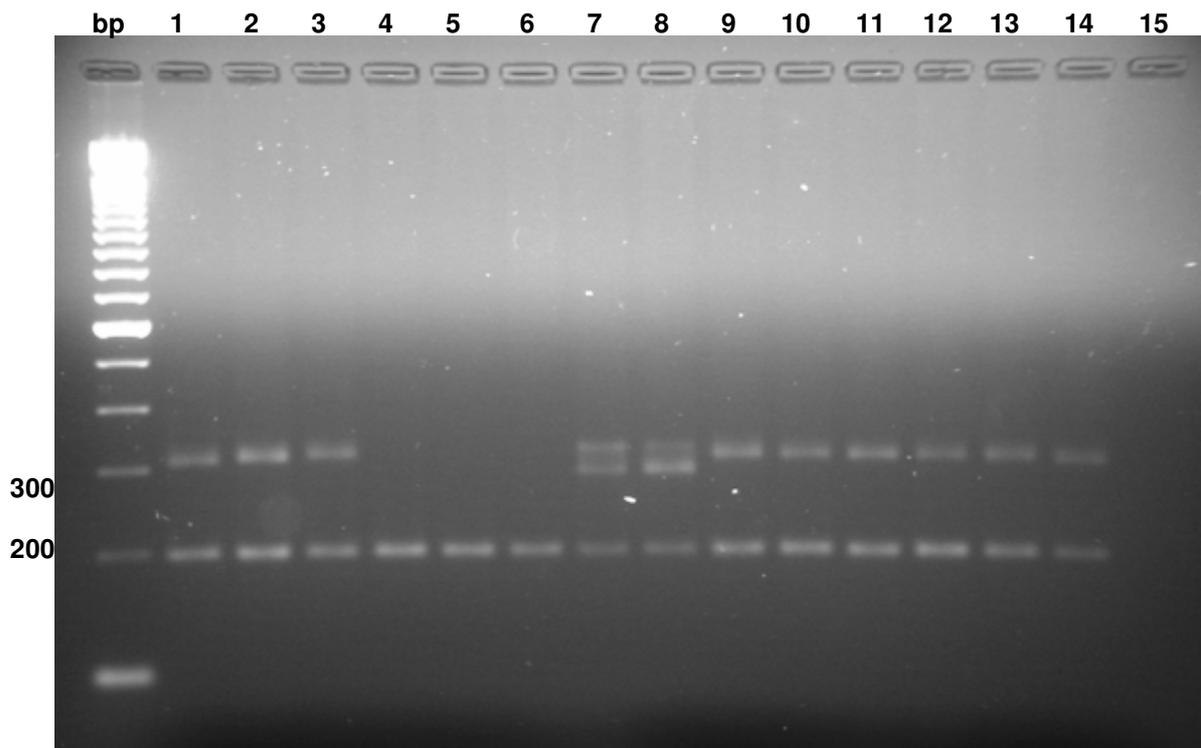


Figura 10 – Gel de agarose a 2,5%, contendo produtos da PCR. À esquerda observa-se um marcador de peso molecular (100pb). As colunas 1,2 e 3 correspondem a um homem normal (apenas 1 alelo); as colunas 4,5 e 6 representam homens afetados (ausência de amplificação); colunas 7 e 8 mulheres heterozigotas normais (dois alelos amplificados); colunas 9, 10, 11, 12, 13 e 14 mulher com resultado inconclusivo (homozigota ou heterozigota com um alelo mutado); e coluna 15 representa o controle negativo. A banda de 200bp corresponde ao controle interno da reação. Fonte: amostras de DNA dos pacientes submetidos ao exame molecular (PCR), Laboratório de Citogenética – Hospital de Apoio (HAB), Brasília, 2007.

6.5 Comparação entre os resultados das técnicas de imuno-histoquímica e PCR em pacientes suspeitos da SXF

Dos 52 pacientes do sexo masculino, em comum, que realizaram os exames imuno-histoquímico e molecular (PCR), 19 pacientes apresentaram resultado positivo para SXF, pelo exame molecular (PCR). O gráfico 1 representa em azul o nível de expressão da proteína FMRP nos indivíduos que foram negativos pela PCR (28,6-100%) e em vermelho estão representados os pacientes portadores da SXF (0-6,2% de expressão FMRP). Todos os controles (90 indivíduos) se situaram acima da linha que representa 75% de expressão da proteína FMRP. Foi possível

observar que a imuno-histoquímica corroborou em 16 casos, mostrando que não havia praticamente nenhuma expressão da proteína FMRP.

Em três pacientes verificou-se alta expressão da proteína FMRP nos bulbos de cabelo analisados, revelando respectivamente 90,2%, 100% e 100% sendo, portanto, considerados normais (falsamente-negativos) pela imuno-histoquímica e afetados pela técnica da PCR. Estas três amostras foram posteriormente repetidas e seus resultados confirmados. A análise citogenética destas mesmas amostras revelou respectivamente uma percentagem de 6,1%, 5,4% e 10% de células com fragilidade cromossômica, valor considerado significativo.

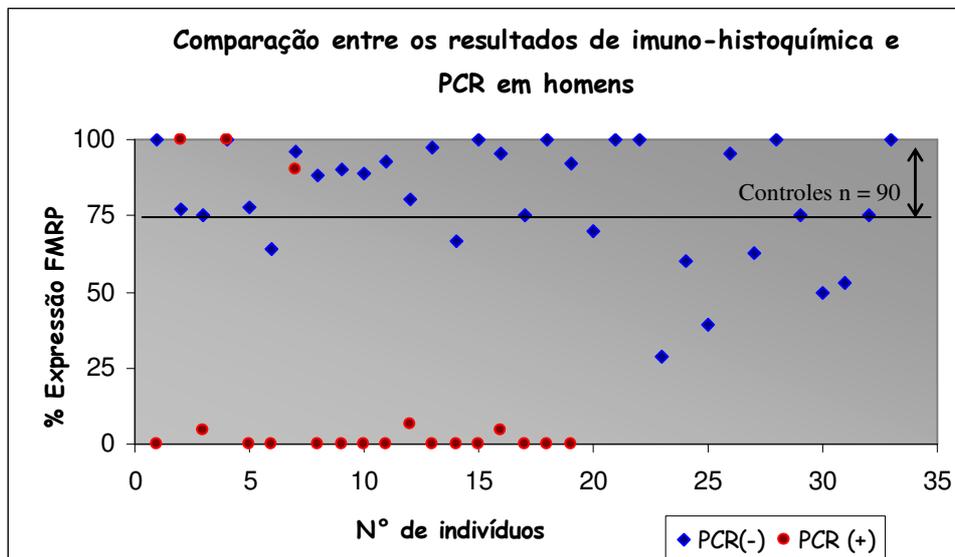


Gráfico 1 – Comparação entre os resultados das técnicas de imuno-histoquímica e PCR, em indivíduos do sexo masculino suspeitos da SXF, Brasília, 2006-2007.

6.6 Comparação entre os resultados das técnicas de citogenética e PCR em pacientes suspeitos da SXF

Nos 59 pacientes do sexo masculino, somente 55 realizaram a análise citogenética e a técnica da PCR. Dezenove pacientes foram concordantes quanto a resultados positivos e 22

pacientes quanto a resultados negativos para a SXF por ambas as técnicas. Quatorze pacientes foram discordantes, apresentando resultados positivos pela citogenética, porém negativos pela PCR. Quatro pacientes que não realizaram um dos exames descritos, sendo conseqüentemente desconsiderados na comparação entre os resultados. Portanto, foi possível constatar que a fragilidade cromossômica observada nos casos suspeitos da SXF nem sempre correspondeu ao sítio frágil em nível de Xq27.3, como pode ser observado no gráfico 2 ao se compararem os resultados obtidos pela citogenética e PCR.

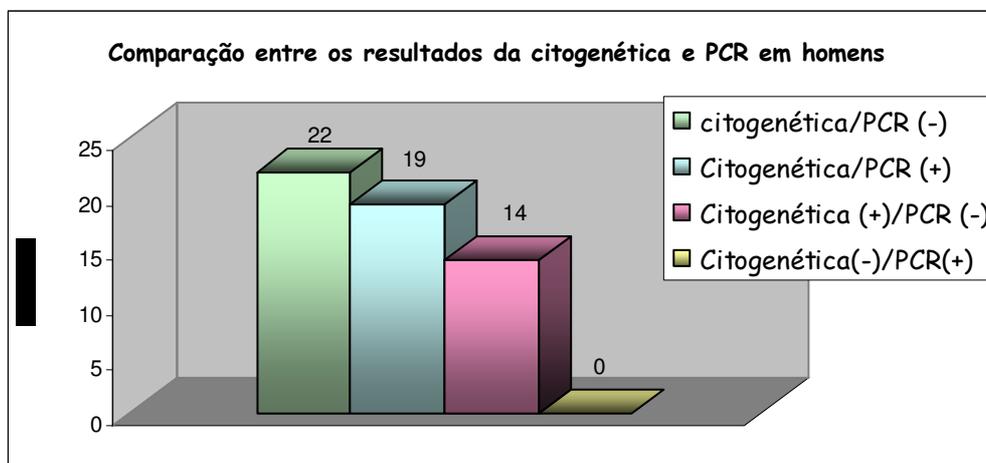


Gráfico 2 – Comparação entre a frequência relativa dos resultados da citogenética e PCR em homens suspeitos da SXF, Brasília, 2006-2007.

6.7 Comparação entre as técnicas de citogenética, imuno-histoquímica e PCR em pacientes do sexo feminino suspeitos da SXF

Dos 46 pacientes do sexo feminino, em comum, que realizaram os exames: citogenético, imuno-histoquímico e molecular (PCR), 27 pacientes apresentaram resultado positivo para SXF, pela análise citogenética, 6 foram positivos pela imuno-histoquímica, enquanto nenhum paciente foi seguramente positivo pelo exame molecular (PCR). O gráfico 3 representa os diferentes

resultados obtidos. Foi possível observar que a imuno-histoquímica quando comparada à citogenética corroborou em 3 casos positivos, 7 casos negativos e o único caso negativo pela PCR foi negativo para as outras duas técnicas citogenética e imuno-histoquímica.

A citogenética foi a melhor técnica entre as realizadas para SXF para mulheres, com maior sensibilidade que as demais. A PCR foi a que obteve maior número de resultados inconclusivos, mostrando-se insatisfatória para triagem da SXF no sexo feminino.

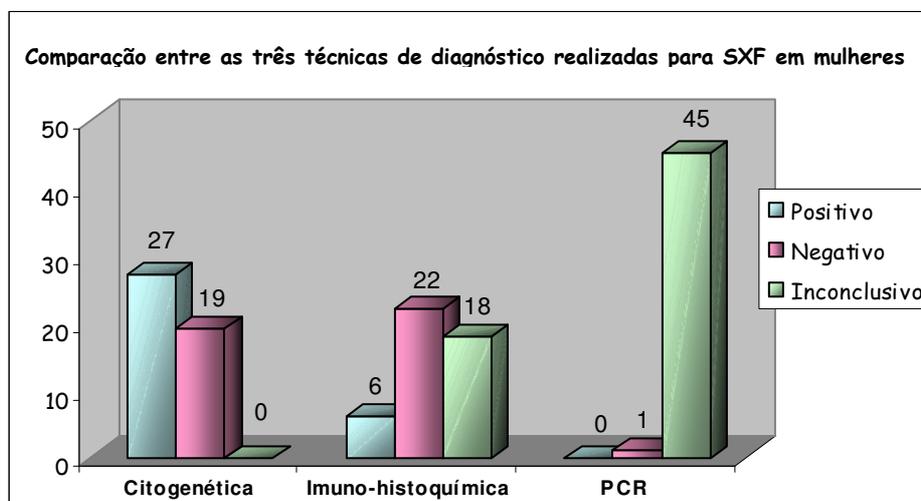


Gráfico 3 – Comparação entre a frequência absoluta dos resultados obtidos pelas técnicas de citogenética, imuno-histoquímica e PCR em mulheres suspeitas da SXF, Brasília, 2006-2007.

6.8 Propriedades estáveis da imuno-histoquímica

Para efeito dos cálculos das propriedades estáveis, os casos inconclusivos pela técnica imuno-histoquímica (9/54) foram considerados negativos. Da comparação com os resultados obtidos pela técnica de PCR utilizando apenas pacientes do sexo masculino, foram obtidos os resultados abaixo (Tabela 8):

Sensibilidade = 84,2% (IC 95% = 68 a 100)

Especificidade = 100%

Valor preditivo positivo = 100%

Valor preditivo negativo = 91,7% (IC 95% = 83 a 100)

Acurácia (exatidão): = 94,2%

| Imuno-histoquímica | PCR | | Total |
|--------------------|----------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 16 (a) | - (b) | 16 |
| Negativo | 3 (c) | 33 (d) | 36 |
| Total | 19 | 33 | 52 |

Tabela 8 – Resultados das análises de imuno-histoquímica e PCR de pacientes do sexo masculino suspeitos da SXF, Brasília, 2006-2007.

6.9 Propriedades estáveis da citogenética

Para efeito de cálculo das propriedades estáveis da citogenética construiu-se a tabela 9, utilizando apenas pacientes do sexo masculino:

Sensibilidade = 100%

Especificidade = 61,1% (IC 95% = 45 a 77)

Valor preditivo positivo = 57,6% (IC 95% = 41 a 75)

Valor preditivo negativo = 100%

Acurácia (exatidão): = 74,5%

| Citogenética | PCR | | Total |
|--------------|----------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 19 (a) | 14 (b) | 33 |
| Negativo | - (c) | 22 (d) | 22 |
| Total | 19 | 36 | 55 |

Tabela 9 – Resultados das análises citogenética e PCR de pacientes do sexo masculino suspeitos da SXF, Brasília, 2006-2007.

Analisando simultaneamente a percentagem dos valores obtidos com as propriedades estáveis entre as duas técnicas imuno-histoquímica e citogenética, construiu-se o gráfico 4 para representar o resultado de cada técnica realizada.

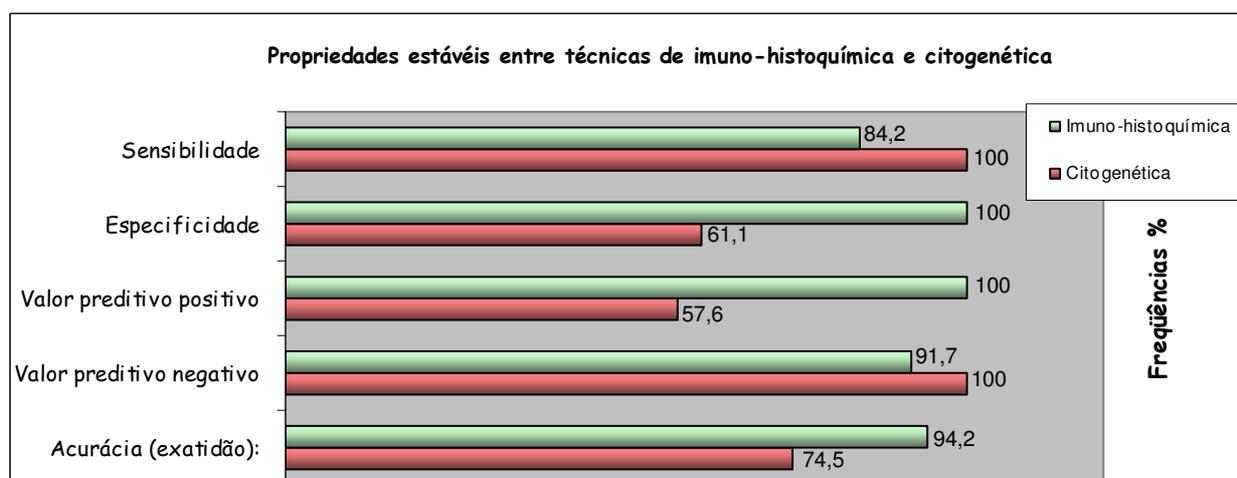


Gráfico 4 – Valores referentes às propriedades estáveis obtidos pela comparação das técnicas de imuno-histoquímica/PCR e citogenética/ PCR em homens suspeitos da SXF, Brasília, 2006-2007.

7. Discussão

Sendo a síndrome do X frágil (SXF) a mais comum causa de retardo mental hereditário há interesse em uma técnica de fácil aplicabilidade e segura para o diagnóstico de portadores. Apesar dos avanços obtidos na área da biologia molecular, durante as últimas décadas, que permitem um diagnóstico preciso e eficiente, observa-se que a SXF ainda é sub-diagnosticada, até mesmo em países em que o serviço de genética é amplamente difundido.

Em países como o Brasil torna-se impossível acompanhar a aceleração imposta pela rápida expansão tecnológica e diversificação dos meios de diagnóstico. Perpetua-se, em consequência, o uso de técnicas já tradicionais que no caso da SXF baseiam-se, principalmente, na identificação do FRAXA no cromossomo X pela técnica citogenética.

No presente estudo o objetivo principal foi o de avaliar a eficácia da técnica de imuno-histoquímica em bulbos de cabelo como método alternativo de diagnóstico em pacientes suspeitos de serem portadores da SXF e, secundariamente, o de comparar seus resultados com os obtidos com a análise citogenética e com a técnica de PCR.

A técnica de imuno-histoquímica, alvo do presente trabalho, apresenta vantagens e desvantagens quando comparada a outras técnicas utilizadas no rastreamento e diagnóstico de portadores da SXF. Dentre as vantagens podem ser citadas: (a) a facilidade da colheita de amostras de bulbo de cabelo e o fato destas poderem facilmente ser enviadas, via postal a centros de referência; (b) ser bem menos invasiva do que a colheita de amostras de sangue; (c) ser uma técnica mais barata, rápida em seu processamento e análise; (d) utilizar materiais e equipamentos de fácil obtenção, geralmente presentes na maioria dos laboratórios; (e) o fato de seu baixo custo permitir estudos de rastreamento mais extensivos permitindo a identificação de novos casos da afecção que é ainda sub-diagnosticada em nosso meio. Dentre as desvantagens podem-se citar: (a) ser técnica subjetiva, dependente de interpretação do observador, quando comparada à técnica de PCR; (b) ser difícil, em raras ocasiões, a obtenção de bulbos de boa qualidade que permitam

análise confiável; (c) o fato de, apesar de ser mais específica que a técnica citogenética perde em sensibilidade e especificidade para a técnica da PCR.

A técnica de imuno-histoquímica no bulbo de cabelo não é nova, tendo sido frequentemente utilizada, desde a década de 70, principalmente na identificação de doenças ligadas ao cromossomo X, tais como a síndrome de Lesch-Nyhan, a deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase e a doença de Fabry (Gartler *et al.*, 1969, 1971; Vermorken *et al.*, 1978).

Os primeiros autores a avaliar a técnica de imuno-histoquímica em bulbo de cabelo para o diagnóstico da SXF foram Willemsen *et al* (1999). Estes autores estudaram trinta e quatro pacientes SXF mentalmente retardados (22 homens e 12 mulheres) e 15 pacientes mentalmente retardados, mas sem as características da SXF excluídos desse diagnóstico por análise de DNA e 130 indivíduos normais como controle (homens e mulheres). No estudo não ficou evidenciada sobreposição na expressão da FMRP no bulbo de cabelo entre indivíduos controles e os pacientes SXF testados. O padrão de expressão da FMRP de indivíduos retardados, mas não portadores da SXF mostrou-se normal nas 15 pessoas. Mulheres portadoras da mutação completa e alguma deficiência mental mostraram expressão (<55%) de FMRP nos bulbos. Também no caso das mulheres não foi observada sobreposição na percentagem de expressão da FMRP nos bulbos de cabelo entre indivíduos controles e pacientes com SXF (Willemsen *et al.*, 1999).

No presente trabalho, indivíduos normais utilizados como controle negativo da técnica de imuno-histoquímica, apresentaram alta expressão da proteína FMRP em bulbos de cabelo analisados, visto que os pacientes afetados pela SXF, não apresentaram praticamente nenhuma expressão na maioria dos bulbos, tabela 6 (p.64) e gráfico 1 (p.67). Foi possível demonstrar que a técnica de imuno-histoquímica apresentou bom poder de diagnóstico nos indivíduos do sexo masculino. A maioria dos bulbos de cabelo de homens afetados pela SXF, confirmados por meio do exame molecular (PCR), foi destituído da proteína FMRP. De acordo com os resultados

obtidos por Willemsen *et al* (1999) em estudo com 22 indivíduos afetados, a maior percentagem encontrada foi de 33% de expressão da proteína FMRP nos bulbos de cabelo, enquanto nos resultados deste estudo, a maior percentagem encontrada no grupo de afetados foi de 6,2% de expressão da proteína FMRP, visto que para os indivíduos normais (controles) a menor percentagem obtida foi de 75% . Logo, pode-se referir que o teste do bulbo de cabelo permitiu a identificação segura, quase absoluta nos pacientes do sexo masculino suspeitos da SXF. Nossos resultados são concordantes com o estudo de Willemsen *et al* (1999) onde os resultados obtidos não apresentaram nenhuma sobreposição da expressão da proteína FMRP entre controles e pacientes afetados pela SXF sugerindo um bom poder discriminatório do teste de imunohistoquímica tanto para os homens afetados como para os controles. Somente três pacientes dos 19 afetados, diagnosticados pela PCR, apresentaram alta expressão da proteína FMRP, gráfico 1 (p.67), sendo conseqüentemente discordantes do resultado obtido pela técnica de imunohistoquímica quando comparados à PCR e à citogenética.

Estes três pacientes apresentaram resultados negativos para SXF pela técnica de imunohistoquímica com mais de 90,2% de expressão da proteína FMRP, porém pela PCR foi possível observar que se tratava de indivíduos afetados, ou seja, nestes casos a imunohistoquímica mostrou-se falsamente-negativa. Correlacionando estes resultados com o exame citogenético, foi possível verificar fragilidade cromossômica acima de 5,4%, frequência esta bem significativa. Esta diferença nos resultados foi de interesse desde que mesmo a repetição da técnica de imunohistoquímica com novas amostras de bulbo de cabelo revelou resultados idênticos aos anteriormente obtidos. Não foi possível encontrar uma explicação exata para esta discrepância, mas possíveis hipóteses levantadas para explicar estes resultados seriam:

(a) a expansão CGG herdada seria proveniente de um mosaicismo e que por instabilidade somática resultaria em perda de cópias das repetições CGG, gerando fragmentos menores (pré-

mutados). De acordo com Thompson & Thompson (2002) o alto grau de instabilidade mitótica pode resultar em maior variabilidade nos números de repetições encontrados entre células do mesmo tecido e entre tecidos somáticos diferentes em um mesmo indivíduo;

(b) os resultados seriam conseqüentes a um “splicing” alternativo, onde as proteínas reguladoras do splicing seriam produzidas de formas diferentes em tecidos e tipos de células diversas, em estágios variados do desenvolvimento do mesmo tecido (Gil Ast, 2004).

(c) a improvável possibilidade de o resultado obtido ser decorrente de deleção total ou parcial do gene *FMRI*, como descritos por Quan *et al* (1995) e Gronskov *et al* (1997), fica descartada, pois se houvesse deleção do gene *FMRI* não haveria produção de FMRP e conseqüentemente os bulbos de cabelo estariam destituídos da FMRP. No entanto, o que se verificou foi uma elevada expressão de FMRP nos bulbos de cabelo analisados.

(d) estes resultados poderiam ser ainda conseqüentes a um erro técnico (fixação, permeabilização e imuno-incubação), esta hipótese é a menos aceitável, por ter sido a técnica repetida com novas amostras de bulbo de cabelo e também por ter sido observada alta expressão da FMRP. Em caso contrário, ou seja, o de uma baixa expressão da FMRP poderia ser considerado fortemente sugestivo de falha técnica ou de baixa qualidade do bulbo de cabelo.

Nos 16 pacientes que se mostraram positivos por ambas as técnicas (imuno-histoquímica e PCR), como pode ser observado no gráfico 1 (p.67), a técnica de citogenética revelou fragilidade cromossômica em todos, com uma frequência variando entre 3,7 e 36%. Nossos dados foram concordantes com os de Staley *et al* (1993), que verificaram tendência à alta expressão citogenética do FRAXA em homens com a mutação completa. A expressão citológica do FRAXA é sem dúvida influenciada pela extensão das repetições CGG, quanto maior o tamanho da expansão, maior será a frequência do sítio frágil observado em cultura (Yu *et al.*, 1992; Staley *et al.*, 1993).

De acordo com os resultados apresentados no gráfico 2 (p.68), onde se comparam os resultados obtidos pela citogenética com os da PCR, pode ser observado valor discordante entre os resultados positivos pela citogenética (14/55), porém negativos pela PCR. Por essa razão, os dados encontrados nos levam a acreditar que a fragilidade verificada seja proveniente de outros sítios frágeis muito próximos ao FRAXA, como por exemplo, o FRAXE e o FRAXF. O sítio frágil FRAXE situado a 600Kb de distância do FRAXA é, indistinguível, do ponto de vista citogenético, do FRAXA sendo sua identificação somente possível por meio da análise molecular (Sutherland *et al.*, 1993).

Embora a mutação do FRAXE seja considerada rara, Brown *et al* (1996) estimando-se aproximadamente 1/50.000 homens, ainda assim é considerada como sub-diagnosticada, devido ao fato do fenótipo desses indivíduos ser geralmente menos chamativo do que os pacientes afetados pela SXF. Conseqüentemente, indivíduos positivos para o FRAXE não estariam sendo testados normalmente. Por estas razões, para definir a real incidência da mutação do gene FMR2 seria necessário a realização rotineira do rastreamento do FRAXE em pacientes com retardo mental diagnosticados como SXF (Santos *et al.*, 2001).

Nossa amostra apresentou concordância quase absoluta entre os resultados da análise das técnicas de imuno-histoquímica, citogenética e PCR em homens afetados e não afetados pela SXF, se considerarmos os resultados inconclusivos pela imuno-histoquímica como negativos. Exceção deverá ser considerada dos três casos que foram positivos pela PCR, porém negativos pela imuno-histoquímica. E dos 14 casos que foram positivos pela citogenética, porém negativos pela PCR, sendo que neste último caso é provável tratar-se da presença de outro sítio frágil que não o FRAXA (FRAXE);

Dois pacientes, do sexo masculino, diagnosticados como portadores da SXF pela análise citogenética apresentaram resultados inconclusivos pela técnica de imuno-histoquímica, o que revela níveis intermediários de expressão da FMRP sendo, no entanto, considerados negativos pela PCR. Estes dois resultados inconclusivos poderiam ser conseqüentes a casos de mosaicismo. Quando a expansão CGG é muito grande se torna instável podendo levar à ocorrência de quebras de diversos tamanhos das expansões em diferentes células constituindo um mosaicismo (Mingroni-Netto, 1995). O mosaicismo explicaria os dados obtidos, pois estes pacientes poderiam apresentar desde células com a pré-mutação até células com mutação completa, mostrando níveis intermediários de expressão FMRP.

No nosso caso, os resultados inconclusivos obtidos pela imuno-histoquímica mostraram níveis maiores de expressão da FMRP respectivamente (60% e 64,3%), sendo, além disso, negativos quando submetidos ao padrão-ouro de diagnóstico (PCR). Estes resultados não foram concordantes com os achados de Willemsen *et al* (1999), que observaram mosaicismo em 10 dos 22 pacientes afetados, com baixa expressão da proteína FMRP ($\leq 30\%$) nos bulbos analisados.

Em relação aos sete casos restantes que apresentaram resultados inconclusivos, todos foram negativos pela PCR e citogenética. Logo, podemos sugerir que o resultado inconclusivo observado neste trabalho seja proveniente provavelmente da má qualidade dos bulbos analisados, em razão da significativa expressão (média de 52,8%) encontrada.

As mulheres têm duas populações de células, nas quais um ou o outro cromossomo X é o ativo, ou seja, elas são mosaicos com relação aos seus genes ligados ao X (Thompson & Thompson, 2002). Além disso, tem sido sugerido por Willemsen *et al* (2003) que o teste do bulbo de cabelo poderia ter um valor preditivo para funcionalidade mental em mulheres portadoras da mutação completa porque, como acontece com o tecido cerebral, os bulbos de cabelo têm também uma origem ectodérmica na embriogênese. Assim, parte da inativação do cromossomo X

nos bulbos de cabelo pode indicar o modelo de inativação do X no cérebro e este caminho refletiria o número de neurônios que expressam a proteína FMRP.

O XIST, gene responsável pela iniciação da inativação do cromossomo X, não é capaz de manter este processo nas linhagens celulares somáticas subsequentes. É preciso que mecanismos específicos de manutenção permaneçam nos descendentes clonais celulares; A metilação é o mecanismo mais freqüente para a manutenção da inativação (Jorde *et al.*, 1996).

Em relação às mulheres, estas obtiveram a maior freqüência (42,4%) de resultados inconclusivos (25/59) quando comparadas ao sexo masculino, tabela 6 (p.64). Isto pode ser explicado pela inativação do cromossomo X, que é um processo determinado aleatoriamente, mas que se mantém nos tecidos. A partir do momento em que um dos cromossomos X é inativado, todos os descendentes clonais daquela célula apresentarão o mesmo X inativo (Thompson & Thompson, 2002).

Nossos resultados são concordantes com os de Willemsen *et al* (1999), que não evidenciaram sobreposição na expressão da FMRP no bulbo de cabelo entre indivíduos controles e mulheres suspeitas da SXF. As mulheres confirmadas como portadoras da mutação completa e alguma deficiência mental mostraram uma expressão da proteína FMRP (<55%) nos bulbos. No presente estudo, embora não tivéssemos como confirmar a presença da mutação completa nas mulheres portadoras fizemos uma analogia ao analisar como se comportaria a técnica de imunohistoquímica quando aplicada a mães de indivíduos afetados do sexo masculino. Realizamos esta análise nas mães dos 20 pacientes do sexo masculino, diagnosticados pela PCR como positivos para SXF. De 15 mães de 20 pacientes que realizaram o exame foram excluídos quatro pacientes cujas mães não puderam ser contatadas (ou por serem adotados ou pelo fato da mãe não residir mais com eles). A mãe de dois filhos afetados só foi citada uma vez. Oito mães manifestaram alta expressão FMRP, sendo, então, consideradas negativas para SXF, seis mães obtiveram resultados

inconclusivos, e somente uma mãe apresentou baixa expressão da proteína FMRP (11,1%), característico de afetada. Possíveis hipóteses foram levantadas para explicar os resultados negativos das mães de afetados pela imuno-histoquímica (portadoras heterozigotas afetadas):

a) o modelo de inativação do cromossomo X no ectoderma durante o desenvolvimento precoce teria padrões similares à inativação do cromossomo X no cérebro e nos bulbos de cabelo (Willemsen *et al.*, 2003), ou seja, inativação do X pelas técnicas que utilizam células sanguíneas (citogenética e PCR) pode não ser similar à inativação do cromossomo X nos neurônios do cérebro e pela técnica do bulbo de cabelo.

b) Segundo Carrel & Willard, 2005, cerca de 15% dos genes do cromossomo X inativo escapam à inativação e expressam-se tanto pelo cromossomo X ativo, como pelo inativo. As mães podem ter escapado à inativação do cromossomo afetado nas células do bulbo de cabelo.

c) a inativação do cromossomo X é bastante estável, porém, em casos raros pode haver desvio no sentido de um tipo preferencial de inativação: a) Lyonização seletiva – inativação ocorre preferencialmente no X onde há defeito, permitindo a seleção de X ativos sem mutação e tendo, portanto, um efeito benéfico; b) Lyonização negativa – neste caso também há uma mutação presente em um dos cromossomos X, mas há uma inativação preferencial do cromossomo X normal, permanecendo o X mutado na maioria dos cromossomos X ativos (Thompson & Thompson, 2002). Logo, o resultado negativo para SXF obtido em mães de pacientes afetados possivelmente fosse conseqüente à Lyonização seletiva nas células do bulbo de cabelo resultando em células normais, ou ainda, que as células sanguíneas tenham sido originadas pela Lyonização negativa, levando à inativação preferencial do cromossomo X não portador da mutação e conseqüentemente a um resultado positivo somente nas técnicas de citogenética e PCR.

A análise citogenética nas 14 mães de pacientes afetados revela cinco mães com resultados negativos, nove mães positivas para SXF. Nas nove mães que apresentaram positividade pela citogenética, a fragilidade cromossômica observada variou de 9,1 a 21,4%, sendo, portanto, uma percentagem significativa.

O resultado do exame molecular (PCR) realizado nas 15 mães de indivíduos afetados foi inconclusivo para a SXF e, conseqüentemente, precisaria ser confirmado pelo método de Southern blot, pois nossos resultados revelaram amplificação de apenas um alelo *FMRI*, não sendo possível distinguir por meio da PCR se: (a) a banda única correspondia a dois alelos sobrepostos, no caso de uma homozigota normal, sendo o seu par de alelos de igual tamanho (em torno de 300pb) ou (b) se teria havido amplificação de apenas um dos alelos (de aproximadamente 300pb), tendo o outro alelo sofrido mutação tratando-se, portanto, de uma heterozigota afetada (Dantas, 2001). Essa segunda hipótese poderia ser considerada significativa em caso de mães portadoras, ao considerarmos que estas mães seriam heterozigotas afetadas.

As discrepâncias entre os métodos de diagnóstico realizados nas mães dos indivíduos afetados pela SXF são nítidas. Os métodos não permitem resultado seguro ao testarmos mulheres normais, mulheres portadoras da pré-mutação ou mulheres afetadas. Como realmente não temos a certeza de que aquelas 15 mães seriam afetadas, desde que poderiam ser consideradas como apenas portadoras da pré-mutação, podendo seus filhos ter conseqüentemente evoluído para mutação completa, teremos somente uma mãe positiva pela imuno-histoquímica e nove positivas pela citogenética para SXF. Mesmo assim, os resultados não coincidem. Logo, as comparações realizadas não permitiram um resultado significativo entre as três técnicas de diagnóstico. Apesar de o resultado molecular ter sido inconclusivo em praticamente todas as mulheres (com exceção de três) se acreditarmos que aquelas 15 mães de pacientes afetados eram realmente heterozigotas afetadas, será o único método com resultados concordantes com o esperado. Porém o mesmo

raciocínio não se aplica às mulheres com suspeita da SXF que apresentaram resultados inconclusivos porque com exceção das três pacientes heterozigotas normais, o restante da amostra, composta por 59 mulheres, mostrou resultados inconclusivos, o que permite deduzir que, em se tratando de mulheres, tanto a PCR, como a imuno-histoquímica não são métodos eficazes, sendo a citogenética a técnica de escolha.

Dentre as 62 mulheres inicialmente analisadas, identificamos apenas três mulheres heterozigotas normais para SXF por meio do exame molecular (PCR). Duas destas mulheres apresentaram resultado inconclusivo pela imuno-histoquímica, e a outra apresentou resultado negativo pela imuno-histoquímica. Nos três casos não foi realizado exame citogenético. Os dois filhos de duas das mulheres (a terceira não tinha filho) foram ambos negativos pela técnica de PCR. No entanto, pela citogenética um paciente apresentou resultado positivo com 10,8% de fragilidade cromossômica, o outro resultado negativo.

Não detectamos correlação significativa entre os resultados obtidos pelas três técnicas em se tratando de mulheres, como apresentadas nas tabelas 4, 6 e 7 (p.61, 64 e 65). Acreditamos que mais estudos e amostras maiores serão necessários para esclarecer a influência do efeito da inativação de um cromossomo X nos exames aplicados.

É possível supor que a maior dificuldade em evidenciar correlação significativa no caso das mulheres seria devido a um efeito da inativação do cromossomo X sobre a expressão da proteína FMRP nas amostras de bulbos de cabelo, assim como a expressão do FRAXA em cultura de linfócitos. Contudo, há evidências na literatura de que coeficientes de correlação são praticamente idênticos entre o tamanho das repetições CGG e a frequência do FRAXA em caso de homens e de mulheres, o que fala contra uma influência da inativação (Mingroni Netto *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1992).

Os dados apresentados nas tabelas 4, 6, 7 (p.61, 64 e 65) mostram claramente que as mulheres portadoras da pré-mutação e da mutação completa não podem ser distinguidas com segurança das não portadoras por meio das técnicas de imuno-histoquímica, citogenética e PCR. De todas essas três técnicas citadas, a que melhor se aplicou às mulheres foi a citogenética, onde foi verificado que nove mães daqueles indivíduos afetados que realizaram o exame citogenético apresentaram positividade para o FRAXA, sendo a menor frequência observada de 9,1% e a maior de 21,4%. A maioria das mulheres com a pré-mutação, descritas na literatura, é negativa para SXF pela análise citogenética (Rousseau *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1992). No presente estudo, as menores frequências encontradas do FRAXA foram: 2%, 2,8% e 5,4%. No entanto, frequências entre 2 e 2,8% foram excluídas das amostras positivas para SXF, ficando em 5,4% a menor percentagem encontrada do FRAXA. Comparando estes casos com o resultado imuno-histoquímico podemos classificar respectivamente as mulheres em afetadas, inconclusivas e normais. Mesmo ao se compararem as maiores frequências de fragilidade cromossômica encontradas, que foram de 30,7% e 34,1% não foi possível obter correlação significativa com a técnica de imuno-histoquímica que nestes casos mostrou-se respectivamente normal e inconclusiva.

Outros estudos precisam ser executados para melhor diagnóstico das mulheres normais, pré-mutadas e afetadas. Aparentemente, o modelo de inativação do cromossomo X pelas técnicas que utilizam sangue não é similar à inativação do cromossomo X nos neurônios do cérebro pela técnica do bulbo de cabelo. Os bulbos de cabelo devem apresentar um valor preditivo da capacidade intelectual das mulheres com a mutação completa, porque são originados da mesma maneira que o tecido cerebral, do ectoderma, durante o desenvolvimento embrionário. É provável que o modelo de inativação do cromossomo X dentro do ectoderma durante o desenvolvimento

precoce causará padrões similares da inativação do cromossomo X no cérebro e nos bulbos de cabelo (Willemsen *et al.*, 2003).

Com base nestes dados, a técnica de imuno-histoquímica não seria adequada para diagnóstico de mulheres afetadas ou portadoras da pré-mutação devido à grande possibilidade de resultados falsamente negativos, mesmo com grande número de bulbos analisados. A técnica preferencial para o diagnóstico em mulheres continua sendo o Southern blot, porém devido à complexidade desta técnica, o seu alto custo e à freqüente inexistência de instalações adequadas para sua execução, a técnica de citogenética pode ser considerada a melhor opção entre os três métodos aqui analisados.

Além do controle negativo utilizado para distinguir principalmente os homens afetados de uma possível falha na reação, podemos citar outros pontos que fizeram da PCR a melhor técnica utilizada neste trabalho em indivíduos do sexo masculinos, como: (a) várias amostras podem simultaneamente ser processadas e analisadas com baixo custo e rapidez, sendo possível a obtenção dos resultados no mesmo dia; (b) evita-se o uso de material radiativo como é o caso da técnica do Southern blot desde que, apesar da existência de marcação a frio, muitos centros ainda realizam a técnica por meio de sondas radioativas devido ao seu menor custo; (c) pequena quantidade de DNA é suficiente para realização da técnica e (d) apresenta boa sensibilidade e especificidade, respectivamente de 99% e 100%.

Quanto às desvantagens da PCR podemos enfatizar a sua já mencionada ineficiência no diagnóstico de mulheres homozigotas normais de heterozigotas afetadas, e os diferentes estágios de mutação (pré-mutação e mosaicismo).

O exame citogenético foi o primeiro exame utilizado rotineiramente para diagnóstico de portadores da SXF. Logo surgiram as técnicas moleculares de diagnóstico, no final da década de 80, que são sem dúvida, mais sensíveis e específicas, porém, muito caras. Esta seqüência de

eventos não fez, em absoluto, com que a citogenética perdesse seu lugar central, mas pelo contrário, com esta associação à biologia molecular, ganhou ela novo poder de resolução abrindo a era da citogenética molecular (Mingroni Netto, 1995).

O diagnóstico citogenético de rotina é realizado por meio da cultura de linfócitos. A sua principal desvantagem, além de ser extremamente laboriosa é a de exigir um examinador altamente qualificado. Além disso, o tempo de cultura de células é prolongado (96 horas), exigindo um critério rigoroso no processamento da amostra, a fim de evitar contaminação e conseqüentemente não crescimento e boa qualidade da cultura.

A técnica de bandamento G é importante na identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais presentes em várias síndromes genéticas que cursam com o RM. Embora de utilidade limitada no diagnóstico da SXF, mostra-se útil quando empregado em pacientes que obtiveram resultados negativos pelas técnicas de PCR e imuno-histoquímica, por permitir a possível identificação de outros sítios frágeis (Marini *et al.*, 1997).

Estudo citogenético e molecular realizado por Marini *et al* (1997) em uma série de 532 pacientes com algumas características fenotípicas sugestivas para a SXF revelou uma prevalência total de outras cromossomopatias da ordem de 3,2%. Comparando os nossos achados com o estudo supracitado, embora os critérios de inclusão e aferição em ambos não sejam exatamente iguais estatisticamente não encontramos nenhuma frequência de cromossomopatia. Apesar dessa ausência é possível deduzir que o emprego sistemático do cariótipo com bandamento G em pacientes negativos para a SXF, é de interesse por permitir o diagnóstico de outras formas de retardo mental associadas à cromossomopatias. Embora consensualmente a análise citogenética não seja a melhor escolha para confirmação da SXF, ela é recomendada para diagnóstico de outros sítios frágeis (FRAXE) além de outras anomalias cromossômicas que, porventura, poderiam estar presentes no paciente em investigação (Carakushansky, 2001). Em nosso estudo

não foi encontrada nenhuma cromossomopatia nas amostras analisadas, ficando evidente somente um polimorfismo em dois casos, onde a heterocromatina apresentava-se aumentada respectivamente nos cromossomos 9 e 16, sendo neste último encontrada fragilidade cromossômica de 3%. Esse polimorfismo acontece de maneira estável na população.

Em programas de rastreamento dos *loci* FRAXA e FRAXE, em que são numerosas as amostras investigadas, o uso da análise por Southern blot é impraticável devido ao alto custo e a demora no procedimento das amostras. Então, a implantação de uma técnica de PCR para o FRAXE pode ser uma ferramenta importante e útil neste tipo da investigação. Também, é questionável se os alelos do FRAXE intermediário e/ou pré-mutados, da mesma forma que os alelos do FRAXA pré-mutados são associados a um fenótipo de inabilidade cognitiva (Santos, *et al.*, 2001).

Para validar um exame laboratorial, necessita-se de uma referência. Essa referência deve ser um outro método considerado de excelência, ou seja, que sempre produza resultados corretos (Pereira, 1995). Para validar a técnica de imuno-histoquímica como método de triagem, empregou-se neste estudo o método da PCR como referência (padrão-ouro), tabela 8 (p. 70), gráficos 1 e 4 (p. 67 e 71).

A sensibilidade e a especificidade são propriedades que qualificam um método e são conhecidas de uma forma genérica como propriedades estáveis, por não sofrerem influência da prevalência do evento sob investigação, aqui representados pela presença da SXF. A sensibilidade significa a probabilidade de um teste, no caso a imuno-histoquímica, em indicar todos os resultados verdadeiramente positivos dentre o universo de doentes (PCR positivos). Quanto a sensibilidade, o método sob validação foi considerado 84,2% sensível por terem gerado três resultados falso-negativos. Por outro lado, a especificidade representa a probabilidade de um dado teste, no caso a imuno-histoquímica, em fornecer resultados verdadeiramente negativos

dentre o universo de indivíduos não doentes ou com a doença sob investigação ausente (PCR negativos). Neste estudo, o método sob validação foi considerado 100% específico (Soares *et al.*, 1999).

Assim sendo, a importância maior da sensibilidade ou da especificidade depende do propósito ao qual o teste se aplica. Quando é proposto para a triagem de uma dada patologia, a sensibilidade torna-se mais importante, visto que se considera bom método de triagem aquele que apresenta menor número possível de resultados falsamente negativos. Por outro lado, a especificidade torna-se importante quando o método sob validação é empregado com o propósito de estabelecer o diagnóstico de uma dada doença entre indivíduos com forte suspeita para aquela doença. Considera-se como sendo um bom método diagnóstico, aquele capaz de apresentar menor número possível de resultados falsamente negativos e conseqüentemente, alta especificidade. Na prática, é raramente possível contar com métodos que sejam 100% sensíveis e específicos, daí a importância de se conhecer a aplicabilidade da sensibilidade ou da especificidade, conforme seja a situação em questão de triagem ou de diagnóstico (Pereira, 1995).

A técnica de imuno-histoquímica neste estudo mostrou sensibilidade de 84,2% (IC 95%: 68 a 100) e especificidade de 100%. Desta forma, a sensibilidade e a especificidade da imuno-histoquímica sob validação permitem qualificá-la como sendo um bom método de diagnóstico nos indivíduos do sexo masculino em virtude de ter apresentado somente três resultados falsamente negativos. Porém, apesar destes três casos falsamente negativos pela imuno-histoquímica, a sensibilidade não representa motivo de grande preocupação, devido ao fato de que estes pacientes devem, provavelmente, apresentar uma expansão muito grande, sendo, portanto conseqüência de uma instabilidade ao nível somático (mosaicismo), ou seja, a alta expressão da proteína FMRP deve ser proveniente de células com apenas a pré-mutação, capazes de produzirem a proteína. Estes pacientes foram submetidos a exames complementares

(citogenética e PCR), a fim de garantir um resultado seguro, tendo ambos estes exames apresentado resultados positivos para SXF. A expressão tão evidente da presença da proteína FMRP nestes indivíduos afetados, se torna, então, alvo de investigação de provável mosaïcismo ou “splicing” alternativo. A especificidade de 100% representa o quanto é importante à qualidade de uma amostra.

A acurácia ou exatidão de um método laboratorial significa a probabilidade de um dado teste identificar os verdadeiros positivos e os verdadeiros negativos estabelecidos pelo método de referência (Soares *et al.*, 1999). A acurácia da imuno-histoquímica neste estudo ficou estabelecida em 94,2%, o que permite mais uma vez considerá-la um bom método de diagnóstico entre homens, devido à baixa existência de resultados inconclusivos nesse grupo.

Enquanto as propriedades estáveis (sensibilidade e especificidade) de um método representam as características a ele inerentes, por outro lado, os valores preditivos (positivo e negativo), representam uma questão probabilística que sofre influência da prevalência do evento sob investigação, representada neste estudo pela presença da SXF. O valor preditivo positivo representa a proporção de indivíduos doentes dentre os considerados positivos ao teste, enquanto que o valor preditivo negativo representa a proporção de indivíduos sadios entre os considerados negativos ao teste (Pereira, 1995; Soares *et al.*, 1999). O valor preditivo positivo obtido foi de 100%, ou seja, um indivíduo com a SXF quando testado por este método tem 100% de probabilidade de obter um resultado verdadeiramente positivo. O valor preditivo negativo foi de 91,7% (IC 95%: 83 a 100), ou seja, um indivíduo sem a SXF quando submetido a imuno-histoquímica tem, na prática, 91,7 % de probabilidade de se apresentar como verdadeiramente negativo, em função da ocorrência de três casos falsamente negativos. Os valores preditivos na rotina clínica auxiliam o médico a valorizar ou não um resultado laboratorial, em particular quando se conhece a prevalência do evento na população sob investigação.

A maior eficiência da PCR na triagem de indivíduos do sexo masculino deve-se a inexistência de resultados inconclusivos nesse grupo, o que permite qualificá-la como um eficiente método de triagem da SXF, especialmente entre homens.

Adicionalmente, é importante ressaltar que a técnica imuno-histoquímica em questão representa um método rápido e econômico, o que permite indicá-la como uma alternativa excelente de ferramenta a ser empregada em estudos populacionais extensos que visem estimar a real prevalência da SXF, em particular em populações selecionadas onde se espera alta prevalência deste evento.

Identificação dos pacientes com a SXF é fundamental porque a) permite uma precoce intervenção de estratégias e instrução educacional; b) permite o aconselhamento genético para membros da família com risco de recorrência. A técnica de imuno-histoquímica realizada no bulbo de cabelo possui grande potencial para possível programa de rastreamento de indivíduos com a SXF freqüentadores de instituições especiais ou em escolas para crianças com dificuldade de aprendizagem, seguidas pela cascata de membros em risco da família. A experiência obtida com tais programas pode ser posteriormente ampliada à programas de rastreamentos populacionais.

8. Conclusões

A técnica de imuno-histoquímica em bulbos de cabelo demonstrou:

- a) não ser eficaz no diagnóstico de homens e mulheres com mosaicismo ou suspeitos de serem portadores da pré-mutação ou de mulheres com a mutação completa responsável pela SXF;

- b) na comparação dos métodos rotineiramente utilizados no diagnóstico da SXF (imuno-histoquímico, PCR e citogenético), o método imuno-histoquímico mostrou-se aplicável a um possível rastreamento populacional devido à alta especificidade obtida e melhor proporção de custo-benefício em relação às técnicas anteriormente citadas.

9. Referências

- ABITBOL, M.; MENINI, C.; DELEZOIDE, A.L.; RHYNER, T.; VEKEMANS, M. E MALLETT, J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of *FMRI* expression in the human fetal brain. *Nature Genet.* 4: 147-152, 1993.
- ALLIGHAM-HAWKINS, D.J.; BABUL-HIRJI, R.; CHITAYAT, D.; HOLDEN, J.J.A.; YANG, K.T.; LEE, C.; HUDSON, R.; NOLIN, S.L.; GLICKSMAN, A. Fragile X permutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the international collaborative POF in fragile X study-preliminary data. *Am. J. Med. Genet.* 83: 322-325, 1999.
- ASHLEY, C.T.; WILKINSON, K.D.; REINES, D.; WARREN, S.T. *FMRI* protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262: 563-566, 1993.
- BÄCHNER, D.; STEINBACH, P.; WÖHRLE, D.; JUST, W.; VOGEL, W.; HAMEISTER, H.; MANCA, A.; POUSTKA, A. Enhanced *FMRI* expression in testis. *Nature Genet.* 4: 115-116, 1993.
- BERRY-KRAVIS, E.; HUTTENLOCHER, P.R. Cyclic AMP metabolism in fragile X syndrome. *Ann. Neurol.* 31: 22-26, 1992.
- BERRY-KRAVIS, E.; SKLENA, P. Demonstration of abnormal cyclic AMP production in platelets from patients with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 45: 81-87, 1993.
- BORGHGRAEF, M.; FRYNS, J.P.; VAN DEN BERGHE, H. The female and the fragile X syndrome: data on clinical and psychological findings in 7 fra(X) carriers. *Clin. Genet.* 37: 341-346, 1990.
- BOY, R.; CORREIA, P.S.; LLERENA, J.C.; MACHADO-FERREIRA, M.C.; PIMENTEL, M.M.G. Estudo caso-controle envolvendo pacientes pré e pós-puberais com diagnóstico confirmado por análise molecular. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 59: 83-88, 2001.
- BOWEN, P.; BIEDERMAN, B.; SWALLOW, K.A. The X-linked syndrome of macro-orchidism and mental retardation: further observations. *Am. J. Med. Genet.* 2: 409-414, 1978.
- BROWN, W.T.; HOUCK, G.E.; DING, X.; ZHONG, N.; NOLIN, S.; GLICKSMAN, A.; DOBKIN, C. Reverse mutations in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64: 287-292, 1996.
- BROWN, W.T.; JENKINS, E.C.; COHEN, I.L.; FISCH, G.S.; WOLF-SCHEIN, E.G.; GROSS, A.; WATERHOUSE, L.; FEIN, D.; MASON-BROTHERS, A.; RITVO, E.; RUTTENBERG, B.A.; BENTLEY, W.; CASTELLS, S. Fragile X and autism: a multicenter study. *Am. J. Med. Genet.* 23: 341-352, 1986.
- BROWN, W.T. The Molecular biology of the fragile X mutation. In: HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. (Eds.) *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*, 3rd. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2002. p. 110-135.

- BUTLER, M.G.; MANGRUM, T.; GRUPTA, R.; SINGH, D.N. A 15-item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. *Clin Genet.* 39: 347-354, 1991.
- BUTLER, M.G.; PRATESI, R.; WATSON, M.S.; BREG, W.R.; SINGH, D.N. Anthropometric and craniofacial patterns in mentally retarded males with emphasis on the fragile X syndrome. *Clin. Genet.* 44: 129-138, 1993.
- CANTÚ, J.M.; SCAGLIA, H.E.; GONZÁLEZ-DIDDI, M.; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, P.; MORATO, T.; MORENO, M.E.; GINER, J.; ALCÁNTAR, A.; HERRERA, D.; PÉREZ-PALACIOS, G. Inherited Congenital Normofunctional Testicular Hyperplasia and Mental Deficiency: A Corroborative Study. *Hum. Genet.* 41: 331-339, 1978.
- CANTÚ, J.M.; SCAGLIA, H.E.; MEDINA, M.; GONZÁLEZ-DIDDI, M.; MORATO, T.; MORENO, M.E.; PÉREZ-PALACIOS, G. Inherited Congenital Normofunctional Testicular Hyperplasia and Mental Deficiency. *Hum. Genet.* 33: 23-33, 1976.
- CARAKUSHANSKY, G. *Doenças genéticas em pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- CARREL, L.; WILLARD, H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature.* 434: 400-404, 2005.
- CHAKRAVARTI, A. Fragile X founder effect? *Nature Genet.* 1: 237-238, 1992.
- CIANCHETTI, C.; SANNIO-FANCELLO, G.; FRATTA, A.L. MANCONI, F.; ORANO, A.; PISCHEDDA, M.P.; PRUNA, D.; SPINICCI, G.; ARCHIDIACONO, N.; FILIPPI, G. Neuropsychological, psychiatric, and physical manifestations in 149 members from 18 fragile X families. *Am. J. Med. Genet.* 40: 234-243, 1991.
- COHEN, I.L.; NOLIN, S.L.; SUDHALTER, V.; DING, X.H.; DOBKIN, C.S.; ROWN, W.T. Mosaicism for the *FMRI* gene influences adaptive skills development in fragile X affected males. *Am. J. Med. Genet.* 64: 365-369, 1996.
- CRONISTER, A.; SCHREINER, R.; WITTENBERGER, M. AMIRI, K.; HARRIS, K.; HAGERMAN, R.J. Heterozygous fragile X female: historical, physical, cognitive and cytogenetic features. *Am. J. Med. Genet.* 38: 269-274, 1991.
- DAKER, M.G.; CHIDIAC, P.; FEAR, C.N.; BERRY, A.C. Fragile X in a normal male: a cautionary tale. *Lancet.* 1: 780, 1981.
- DANTAS, R.C. *Síndrome do X frágil na Rede Sarah de Hospitais do Aparelho Locomotor: estudo molecular e estimativa de prevalência*. Brasília, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência da Reabilitação). Rede Sarah de Hospitais do Aparelho Locomotor.
- DE BOULLE, K.; VERKERK, A.J.; REYNIERS, E.; VITS, L.; HENDRICK, J.; VAN BOY, B.; VAN DEN BOS, F.; DE GRAAFF, E.; OOSTRA, B.A. WILLEMS, P.J. A point mutation in the *FMRI* gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* 3: 31-35, 1993.

- DENNIS, N.R.; CURTIS, G.; MACPHERSON, J.N.; JACOBS, P.A. Two families with Xq27.3 fragility, no detectable insert in the *FMR1* gene, mild mental impairment and absence of the Martin-Bell phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 43: 232-236, 1992.
- DE VRIES, B.B.A.; HALLEY, D.J.J. The Fragile X syndrome. *J Med Genet.* 35: 579-589, 1998.
- DE VRIES, B.B.A.; SEVERIJNEN, L-A, JACOBS, A.; OLMER, R.; HALLEY, D.J.J.; OOSTRA, B.A.; WILLEMSSEN, R. FMRP expression studies in blood and hair roots in fragile X family with methylation mosaics. *J Med Genet.* 40: 535-539, 2003.
- DEVYS, D.; BIANCALANA, V.; ROUSSEAU, F.; BOUÉ, J.; MANDEL, J.L.; OBERLÉ, I. Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am. J. Med. Genet.* 43: 208-216, 1992.
- DEVYS, D.; LUTZ, Y.; ROUYER, N.; BELLOCQ, J.P.; MANDEL, J.L. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X permutation. *Nature Genet.* 4: 335-340, 1993.
- DUNN, H.G.; RENPENNING, H.; GERRARD, J.W.; MILLER, J.R.; TABATA, T.; FEDEROFF, S. Mental retardation as a sex-linked defect. *Am. J. Mental Def.* 67: 827- 848, 1963.
- EICHLER, E.E.; RICHARDS, S.; GIBBS, R.A.; NELSON, D.L. Fine structure of the human *FMR1* gene. *Hum Mol Genet.* 8: 1147-153, 1993.
- EICHLER, E.E.; HOLDEN, J.J.A.; POPOVICH, B.W.; REISS, A.L.; SNOW, K.; THIBODEAU, S.N.; *et al.* Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMRI gene. *Nature Genet.* 8: 88-94, 1994.
- ELAHI, E.; KHODADAD, A.; KUPERSHMIDT, I.; GHASEMI, F.; ALINASAB, B.; NAGHIZADEH, R.; EASON, R.G.; AMINI, M.; ESMAILI, M.; ESMAEILI DOOKI, M.R.; SANATI, M.H.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; THORSTENSON, Y.R. A haplotype framework for cystic fibrosis mutations in Iran. *J. Mol. Diagn.* 8(1): 119–127, 2006.
- ESCALANTE, J.A.; FROTA-PESSOA, O. Retardamento mental. In: BEÇAK, W. *et al.*(Eds.). *Genética médica.* São Paulo: Sarvier, 1973, pp. 300-308.
- ESCALANTE, J.A.; GRUNSPUN, H.; FROTA-PESSOA, O. Severe sex-linked mental retardation. *J. Genet. Hum.* 19: 137-140, 1971.
- FENG, Y. GUTEKUNST, C.A.; EBERHART, D.E.; YI, H.; WARREN, S.T.; HERSCH, S.M. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J. Neurosci.* 17: 1539-1547, 1997.

- FINELLI, P.F.; PUESCHEL, S.M.; PADRE-MENDOZA, T.; O'BRIEN, M.M. Neurological findings in patients with the fragile-X syndrome. *J. Neurol. Neuros. Psychiatr.* 48: 150-153, 1985.
- FISCH, G.S.; ARINAMI, T.; FROSTER-ISKENIUS, U.; FRYNS, J.P.; CURF, L.M.; BORGHGRAEF, M.; HOWARD-PEEBLES, P.N., *et al.* Relationship between age and IQ among fragile X males: A multicenter study. *Am J Med Genet.* 38: 481-487, 1991.
- FISCH, G.S. Is autism associated with the fragile X syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 43: 47-55, 1992.
- FISCH, G.S. What is associated with the fragile X syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 48: 112-121, 1993.
- FLYNN, G.A.; HIRST, M.C.; KNIGHT, S.J.L.; MACPHERSON, J.N.; BARBER, J.C.K.; FLANNERY, A.V.; DAVIES, K.E.; BUCKLE, V.J. Identification of the FRAXE fragile site in two families ascertained for X linked mental retardation. *J. Med. Genet.* 30: 97-100, 1993.
- FREUND, L.S.; REISS, A.L.; ABRAMS, M.T. Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics.* 91: 321-329, 1993.
- FRYNS, J.P. The female and the fragile X: a study of 144 obligate female carriers. *Am. J. Med. Genet.* 23: 157-169, 1986.
- FU, Y.H.; HUHL, D.P.; PIZZUTI, Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 67(6):1047-058, 1991.
- GANE, L.W.; CRONISTER, A. Genetic counseling. In: HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. (Eds.) Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research. 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2002, p. 251-286.
- GARTLER, S.M.; GANDINI, E.; ANGIONI, G.; ARGIOLAS, N. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a tracer in the study of the development of hair root cells. *Ann Hum Genet.* 33: 171-176, 1969.
- GARTLER, S.M., SCOTT, R.C.; GOLDSTEIN, J.L.; CAMPBELL, B. Lesh-Nyhan syndrome: rapid detection of heterozygotes by use of hair follicles. *Science.* 172:572-574, 1971.
- GEDEON, A.K.; BAKER, E.; ROBINSON, H.; PARTINGTO, M.W. Fragile X syndrome without CCG amplification has no *FMRI* deletion. *Nature Genetics.* 1(5):341-4, 1992.
- GERARD, B.; LÊ HEUZEY, M.F.; BRUNIE, G.; LEWINE, P.; SAIAG, M.C.; CACHEUX, V.; *et al.* Systematic screening for fragile X syndrome in a cohort of 574 mentally retarded children. *Ann Genetic.* 40(3):139-44, 1997.

- GIANGRECO, C.A.; STEELE, M.W.; ASTON, C.E. *et al.* A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *The Journal of Pediatrics*. 129: 611-614, 1996.
- GIBSON, T.J.; RICE, P.M.; THOMPSON, J.D.; HERINGA, J. KH domains within the FMR 1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. 18: 331-333, 1993.
- GIRAUD, F.; AYME, S.; MATTEI, J.F.; MATTEI, M.G. Constitutional Chromosomal Breakage. *Hum. Genet.* 34: 125-136, 1976.
- GRONSKOV, K.; HJALGRIM, H.; BJERAGER, M.O.; BRONDUM-NIELSEN, K. Deletion of all CGG repeats plus flanking sequences in FMR-1 does not abolish gene expression. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 961-967, 1997.
- GU, Y.; LUGENBEEL, K.A.; VOCKLEY, J.G. A de novo deletion in *FMRI* in a patient with developmental delay. *Hum Mol Genetics*. 3(9):1705-6, 1994.
- HAGERMAN, R.J.; VAN HOUSEN, K.; SMITH, A.C.M.; McGAVRAN, L. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 111-121, 1984.
- HAGERMAN, R.J.; ALTSHUL-STARK, D.; MCBOGG, P. Recurrent otitis media in boys with fragile X syndrome. *Am. J. dis. Child.* 141: 184-187, 1987.
- HAGERMAN, R.J. Fragile X syndrome. *Curr. Probl. Pediatr.* 17, 1987
- HAGERMAN, R.J.; SCHREINER, R.A.; KEMPER, M.B.; WITTENBERGER, M.D.; ZAHN, B.; HABICHT, K. Longitudinal IQ changes in fragile X males. *Am. J. Med. Genet.* 33: 513-518, 1989.
- HAGERMAN, R.J.; AMIRI, K.; CRONISTER, A. The Fragile X Checklist. *Am. J. Med. Genet.* 38, 1991.
- HAGERMAN, R.J.; JACKSON, C. ;AMIRI, K.; SILVERMAN, A.C.; O'CONNOR, R.; SOBESKY, W. Girls with fragile X syndrome: physical and neurocognitive status and outcome. *Pediatrics*. 89: 395-400, 1992.
- HAGERMAN, R.J.; HULL, C.E.; SAFANDA, J.F. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am. J. Med. Genet.* 51: 298-308, 1994.
- HAGERMAN, R.J. Fragile X syndrome: Meeting the challenges of diagnosis and care. *Contemporary Pediatrics*. 14: 31-59, 1997.

- HAGERMAN, R.J.; LEEHEY, M.; HEINRICHS, W.; TASSONE, F.; WILSON, R.; HILLS, J.; GRIGSBY, J.; GAGE, B.; HAGERMAN, P.J. Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*. 57: 127-130, 2001.
- HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. *Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment and research*. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 3-109, 2002.
- HAGERMAN, P.J.; GRECO, C.M.; HAGERMAN, R.J. A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X permutation carriers. *Cytogenet Genome Res*. 100: 206-212, 2003.
- HAMMOND, L.S.; MACIAS, M.M.; TARLETON, J.C. Fragile X syndrome and deletions in FMR-1: new case and review of the literature. *Am. J. Med. Genet*. 72: 430-434, 1997.
- HANSEN, R.S.; CANFIELD, T.K.; LAMB, M.M.; GARTLER, S.M.; LAIRD, C.D. Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR-1 gene. *Cell*. 73: 1403-1409, 1993.
- HANSON, D.M.; JACKSON, A.W.; HAGERMAN, R.J. Speech disturbances (cluttering) in mildly impaired males with the Martin-Bell/Fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 23: 195-206, 1986.
- HARVEY, J.; JUDGE, C.; WIENER, S. Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J. Med. Genet*. 14: 46-50, 1977.
- HECHT, F.; RAMESH, K.H.; LOCKWOOD, D.H. A guide to fragile sites on human chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet*. 44: 37-45, 1990.
- HEITZ, D.; DEVYS, D.; IMBERT, G.; KRETZ, C.; MANDEL, J.L. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X permutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J. Med. Genet*. 29: 794-801, 1992.
- HERBST, D.S.; MILLER, J.R. Nonspecific X-linked Mental Retardation II: The Frequency in British Columbia. *Am. J. Med. Genet*. 7: 461-469, 1980.
- HINDS, H.L.; ASHLEY, C.T.; SUTCLIFFE, J.S.; NELSON, D.L.; WARREN, S.T.; HOUSMAN, D.E.; SCHALLING, M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet*. 3: 36-43, 1993.
- HIRST, M.C.; NAKAHORI, Y.; KNIGHT, S.J.L.; SCHWARTZ, C.; THIBODEAU, S.N.; ROCHE, A.; FLINT, T.J.; CONNOR, J.M.; FRYNS, J.P.; DAVIES, K.E. Genotype prediction in fragile X syndrome. *J. Med. Genet*. 28: 824-829, 1991.
- HIRST, M.C.; BARNICOAT, A.; FLYNN, G.; WANG, Q.; DAKER, M.; BUCKLE, V.J.; DAVIES, K.E.; BOBROW, M. The identification of a third fragile site, FRAXF, in Xq27-q28 distal to both FRAXA and FRAXE. *Hum. Mol. Genet*. 2: 197-200, 1993.

- HODAPP, R.M.; DYKENS, E.M.; HAGERMAN, R.A.; SCHREINER, R.A.; LACHIEWICS, A.M.; LECKAMAN, J.F. Developmental implications of changing trajectories of IQ in males with fragile X syndrome. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 29: 214-219, 1990.
- HOWARD-PEEBLES, P.N.; STODDARD, G.R.; MIMS, M.G. Familial X-linked mental retardation, verbal disability and marker X chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 31: 214-222, 1979.
- HOWARD-PEEBLES, P.N.; STODDARD, G.R. Race distribution in X-linked mental retardation with macro-orchidism and fragile site in Xq. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 629-630, 1980.
- IRWIN, S.; GALVEZ, R.; GREENNOUGH, W. Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb. Cortex*, v. 10, p. 1038-1044, 2000.
- IRWIN, S. *et al.* Brain structure and functions of FMR-1 protein. In: HAGERMAN, R.J.; HAGERMAN, P.J. (Eds.) *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research.* 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2002. p. 191-205.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Mitelman.* F.(ed). S. Karger, Basel, 1995.
- JACQUEMONT, S.; HAGERMAN, R.J.; LEEHEY, M.; GRIGSBY, J.; ZHANG, L.; BRUNBERG, J.A.; GRECO, C.; DES PORTES, V.; JARDINI, T.; LEVINE, R.; BERRY-KRAVIS, E.; BROWN, W.T.; SCHAEFFER, S.; KISSEL, J.; TASSONE, F.; HAGERMAN, P.P. Fragile X permutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 869-878, 2003.
- JACQUEMONT, S.; LEEHEY, M.A.; HAGERMAN, R.J.; BECKETT, L.A.; HAGERMAN, P.J. Size bias of fragile X permutation in late-onset movement disorders. *Am. J. Med. Genet.* 43: 804-809, 2006.
- JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; WHITE, R.L. *Genética Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAO, M.J.; WHIE, R.C. *Genética médica.* 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- KNIGHT, S.J.L.; FLANNERY, A.V.; HIRST, M.C.; CAMPBELL, L.; CHRISTODOULOU, Z.; PHELPS, S.R.; POINTON, J.; MIDDLETON-PRICE, H.R.; BARNICOAT, A.; PEMBREY, M.E.; HOLLAND, J.; OOSTRA, B.A.; BOBROW, M.; DAVIES, K.E. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell.* 74: 127-134, 1993.

- KNIGHT, S.J.L.; HIRST, M.C.; ROCHE, A.; CHRISTODOULOU, Z.; HUSON, S.M.; WINTER, R.; FITCHETT, M.; MCKINLEY, M.J.; LINDENBAUM, R.H.; NAKAHORI, Y.; DAVIES, K.E. Molecular studies of the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 43: 217-223, 1992.
- KNOBLOCH, O.; PELZ, F.; WICK, U.; NELSON, D.L.; ZOLL, B. Direct versus indirect molecular diagnosis of fragile X mental retardation in 40 German families at risk. *J. Med. Genet.* 30: 193-197, 1993.
- KOOIJ, R.F.; OOSTRA, B.A.; WILLEMS, P.J. *The fragile X syndrome and other fragile site disorders*. Springer: 1998, pp1-48.
- LACHIEWICZ, A.M. Abnormal behaviors of young girls with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 43: 72-77, 1992.
- LAIRD, C.D. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics.* 117: 587-599, 1987.
- LAIRD, C.; JAFFE, E.; KARPEN, G.; LAMB, M.; NELSON, R. *Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA*. *Trends Genet.* 3: 274-281, 1987.
- LAIRD, C.D. Possible erasure of the imprint on a fragile X chromosome when transmitted by a male. *Am. J. Med. Genet.* 38: 391-395, 1991.
- LEHRKE, R. A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am. J. Ment. Def.* 76: 611-619, 1972.
- LI, Z.; ZHANG, Y.; KU, L.; WILKINSON, K.D.; WARREN, S.T.; FENG, Y. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res.* 29: 2276-2283, 2001.
- LOEHR, J.P.; SYNHORST, D.P.; WOLFE, R.R.; HAGERMAN, R.J. Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 23: 189-194, 1986.
- LUBS, H.A. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21: 231-244, 1969.
- LUO, S.; ROBINSON, J.C.; REISS, A.L.; MIGEON, B.R. DNA methylation of the fragile X locus in somatic and germ cells during fetal development: relevance to the fragile X syndrome and X inactivation. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 19: 393-404, 1993.
- MACPHERSON, J.N.; NELSON, D.L.; JACOBS, P.A. Frequent small amplifications in the FMR-1 gene in fra(X) families: limits to the diagnosis of premutations. *J. Med. Genet.* 29: 802-806, 1992.
- MALMGREN, H.; GUSTAVSON, K.H.; WAHLSTROM, J.; ARPI-HENRIKSSON, I.; BENSCH, J.; PETTERSSON, U.; DAHL, N. Infantile autism – fragile X: molecular findings support genetic heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* 44: 830-833, 1992.

- MARINI, T.; PFLUEGER, S.; JACKSON, A.; NABER, S.; KARPELLS, S.; NAEEM, R. A five-year experience with fragile X testing. *Diag Mol Pathology*; 1997. 6(3):161-66.
- MARTIN, J.P.; BELL, J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiatry*. 6: 154-157, 1943.
- MELO, S.S.; PERSUHN, D.C.; MEIRELLES, M.S.; JORDAO, A.A.; VANNUCCHI, H. A polymorphisms in the methylene-tetrahydrofolate gene: effect of folic acid on homocysteine levels. *Mol.Nutr.Food.Res.*50(8):769-74,2006.
- MERENSTEIN, S.A.; SOBESKY, W.E.; TAYLOR, A.K. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR-1 mutation. *Am. J. Med. Genet.* 64: 388-394, 1996.
- MIGEON, B.R. Concerning the role of X-inactivation and DNA methylation in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 43: 291-298, 1992.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.T.; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215, 1988.
- MINGRONI-NETTO, R.C. *Retardo mental associado ao cromossomo X frágil: frequência entre alunos de escolas especiais e caracterização fenotípica da síndrome.* São Paulo, 1988. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da USP.
- MINGRONI-NETTO, R.C. *Série monografias n° 02.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.
- MINGRONI-NETTO, R.C.; HADDAD, L.A.; VIANNA-MORGANTE, A.M. The number of CGG repeats of the FMR-1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism. *Am. J. Med. Genet.* 64: 270-273, 1996.
- MINGRONI-NETTO, R.C.; PAVANELLO, R.C.M.; OTTO, P.A.; VIANNA-MORGANTE, A.M. Experience with molecular and cytogenetic diagnosis of fragile X syndrome in Brazilian families. *Rev. Bras. Genet.*, v. 20, p. 731-739, 1997.
- MOORE, P.S.J.; CHUDLEY, A.E.; WINTER, J.S.D. True precocious puberty in a girl with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 37: 265-267, 1990.
- MOOREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M. E HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616, 1960.
- MORNET, E.; Jokic, M.; BOGYO, A.; TEJADA, I.; DELUCHAT, C.; BOUÉ, J.; BOUÉ, A. Affected sibs with fragile X syndrome exhibit an age-dependent decrease in the size of the fragile X full mutation. *Clin. Genet.* 43: 157-159, 1993.
- MORTON, N.E.; MACPHERSON, J.N. Population genetics of the fragile X syndrome: multiallelic model for the FMR 1 locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4215-4217, 1992.

- MUSUMECI, S.A.; FERRI, R.; COLOGNOLA, R.M.; NERI, G.; SANFILIPPO, S.; BERGONZI, P. Prevalence of a novel epileptogenic EEG pattern in the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 30: 207-212, 1988.
- NAKAHORI, Y.; KNIGHT, S.J.L.; HOLLAND, J.; SCHWARTZ, C.; ROCHE, A.; TARLETON, J.; WONG, S.; FLINT, T.J.; FROSTER-ISKENIUS, U.; BENTLEY, D.; DAVIES, K.E.; HIRST, M.C. Molecular heterogeneity of the fragile X syndrome. *Nucleic Acids Res.* 19: 4355-4359, 1991.
- NAVAJAS, L.; ROSENBERG, C.; VIANNA-MORGANTE, A.M. Genetic counseling in Martin-Bell syndrome. *Rev. Bras. Genet.* 2: 333-340, 1987.
- NIELSEN, K.B.; TOMMERUP, N.; POULSEN, H.; JACOBSEN, P.; BECK, B.; MIKKELSEN, M. Carrier detection and X-inactivation studies in the fragile X syndrome. Cytogenetic studies in 63 obligate and potential carriers of the fragile X. *Hum. Genet.* 64: 240-245, 1983.
- NOLIN, S.L.; BROWN, W.T.; GLICKSMAN, A.; HOUCK, G.E.Jr.; GARGANO, A.D.; SULLIVAN, A.; BIANCALANA, V.; BRONDUM-NIELSEN, K.; HJALGRIM, H.; HOLINSKI-FEDER, E.; KOOY F.; LONGSHORE, J.; MACPHERSON, J.; MANDEL, J.L.; MATTHIJS, G.; ROUSSEAU, F.; STEINBACH, P.; VAISANEN, M.L.; VON KOSKULL, H.; SHERMAN, S.L. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 454-464, 2003.
- OBERLÉ, I.; ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; KRETZ, C.; DEVYS, D. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 252:1097-1102, 1991.
- OBERLÉ, I.; BOUÉ, M.J.F.; CROQUETTE, M.F.; VOELCKEL, M.A.; MATTEI, M.G.; MANDEL, J.L. Three families with high expression of a fragile site at Xq27.3, lack of anomalies at the FMR-1 CpG island, and no clear phenotypic association. *Am. J. Med. Genet.* 43: 224-231, 1992.
- OOSTRA, B.A.; JACKY, P.B.; BROWN, W.T.; ROUSSEAU, F. Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. *J. Med. Genet.* 30: 410-413, 1993.
- OOSTRA, B.A. Fragile X syndrome in humans and mice. *Acta Genet Med Gemellol.* 45: 93-108, 1996.
- OPITZ, J.M.; WESTPHAL, J.M.; DANIEL, A. Discovery of a connective tissue dysplasia in the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 101-109, 1984.
- OPITZ, J.M. On the gates of hell and a most unusual gene. *Am. J. Med. Genet.* 23: 1-10, 1986.
- OTTO, P.G.; OTTO, P.A.; FROTA-PESSOA, O. *Genética humana e clínica.* 1ª ed. São Paulo: Roca, 1998.

- PANDEY, U.B.; PHADKE, S.R.; MITTAL, B. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurol Índia*. 52: 36-42, 2004.
- PAUL, R.; COHEN, D.J.; BREG, W.R.; WATSON, M.; HERMAN, S. Fragile X syndrome: its relation to speech and language disorders (Letter). *J. Sp. Hear. Disord*. 49: 326-336, 1984.
- PEREIRA, M.G. Métodos empregados em epidemiologia. In: *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1995, pp.269-288.
- PIRETTI, M. ZHANG, F.P.; FU, Y.H.; WARREN, S.T.; OOSTRA, B.A.; CASKEY, C.T.; NELSON, D.L. Absence of expression of the *FMR1* gene in fragile X syndrome. *Cell*. 66: 817-22, 1991.
- RIDDLE, J.E.; CHEEMA, A.; SOBESKY, W.E.; GARDNER, S.C.; TAYLOR, A.K.; PENNINGTON, B.F.; *et al.* Fenotypic involvement in female with the *FMR1* gene mutation. *Am J Mental Retardation*. 102(6): 590-601, 1998.
- PRIEST, J. H.; THULINE, H.C.; LAVECK, G.D.; JARVIS, D.B. An approach to genetic factors in mental retardation. *Am. J. Ment. Defic*. 66: 42-50, 1961.
- RAMOS-FUENTES, F.J. Nuevos métodos de diagnóstico del síndrome X frágil: estudio de la FMRP en sangre y pelo. *Rev Neurol*. 33: 9-13, 2001.
- REISS, A.L.; FEINSTEIN, C.; TOOMEY, K.E.; GOLDSMITH, B.; ROSENBAUM, K.; CARUSO, M.A. Psychiatric disability associated with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 23: 393-401, 1986.
- REISS, A.L.; AYLWARD, E.; FREUND, L.S.; JOSHI, P.K.; BRYAN, R.N. Neuroanatomy of Fragile X Syndrome: the Posterior Fossa. *Ann. Neurol*. 29: 26-32, 1991.
- REISS, A.L. FREUND, L.; ABRAMS, M.T.; BOEHM, C.; KAZAZIAN, H. Neurobehavioral effects of the fragile X permutation in adult women: a controlled study. *Am. J. Hum. Genet*. 52: 884-894, 1993.
- REISS, A.L. FREUND, L.; VINOGRADOV, S.; HAGERMAN, R.; CRONISTER, A. Parental inheritance and psychological disability in fragile X females. *Am. J. Hum. Genet*. 45: 697-705, 1989.
- REISS, A.L. HAGERMAN, R.J.; VINOGRADOV, S.; ABRAMS, M.; KING, R.J. Psychiatric disability in female carriers of the fragile X chromosome. *Arch. Gen. Psychiatry*. 45: 25-30, 1988.
- REYNIERS, E.; VITS, L.; DEBOULLE, K.; VAN ROY, B.; VAN VELZEN, D.; DE GRAAFF, E.; VERKERK, A.J.M.H.; JORENS, H.Z.J.; DARBY, J.K.; OOSTRA, B; WILLEMS, P.J. The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nature Genet*. 4: 143-146, 1993.

- RICHARDS, B.W.; SYLVESTER, P.E.; BROOKER, C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. *J. Ment. Defic. Res.* 25: 253-256, 1981.
- RICHARDS, R.I. HOLMAN, K.; FRIEND, K.; KREMER, E.; HILLEN, D.; STAPLES, A.; BROWN, W.T.; GOONEWARDENA, P.; TARLETON, J.; SCHWARTZ, C.; SUTHERLAND, G.R. Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 1: 257-260, 1992.
- RICHARDS, R.I.; HOLMAN, K. YU, S.; SUTHERLAND, G.R. Fragile X syndrome unstable element, p(CCG)n, and other simple tandem repeats are binding sites for specific nuclear proteins. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1429-1435, 1993.
- ROMAIN, D.R.; CHAPMAN, C.J. Fragile site Xq27.3 in a family without mental retardation. *Clin. Genet.* 41: 33-35, 1992.
- ROUSSEAU, F.; HEITZ, D.; BIANCALANA, V.; BLUMENFELD, S.; KRETZ, C.; BOUÉ J, *et al.* Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N England J Med.* 325: 1673-681, 1991.
- ROUSSEAU, F. The fragile X syndrome: implications of molecular genetics for the clinical syndrome. *Eur. J. Clin. Investig.* 24: 1-10, 1994.
- ROUSSEAU, F.; ROUILLARD. P.; MOREL, M.L.; *et al.* Prevalence of carries of permutation-size alleles of the *FMRI* gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet.* 57: 1006-1018, 1995.
- QUAN, F.; ZONANA, J.; GUNTER, K. An Atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the *FMRI* gene. *Am J Hum Genetics.* 56(5): 1042-51, 1995.
- SANFILIPPO, S. RAGUSA, R.M.; MUSUMECI, S.; NERI, G. Fragile X mental retardation: prevalence in a group of institutionalized patients in Italy and description of a novel EEG pattern. *Am. J. Med. Genet.* 23: 589-595, 1986.
- SANTOS, C.B.; COSTA LIMA, M.A.; PIMENTEL, M.M.G. A new PCR assay useful for screening of FRAXE/FMR2 mental impairment among males. *Human Mutation.* 18:157-162, 2001.
- SEABRIGHT. M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2:971-972, 1971.
- SHERMAN, S.L.; MORTON, N.E.; JACOBS, P.A.; TURNER, G. The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann. Hum. Genet.* 48: 21-37, 1984.
- SHERMAN, S.L.; JACOBS, P.A.; MORTON, N.E.; FROSTER-ISKENIUS, U.; HOWARD-PEEBLES, P.N.; NIELSEN, K.B.; PARTINGTON, M.W.; SUTHERLAND, G.R.; TURNER, G.; WATSON, M. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69: 289-299, 1985.

- SHERMAN, S.L.; Epidemiology in: Hagerman, R. J.; Silverman, A. C., eds. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research. Baltimore, London: The Johns Hopkins University Press, 1991, p. 69-97.
- SHERMAN, S.L. Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 97: 189-194, 2000.
- SIOMI, H.; SIOMI, M.C.; NUSSBAUM, R.L.; DREYFUSS, G. The protein product of the fragile X gene, *FMR1*, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 74: 291-298, 1993.
- SIOMI, H.; CHOL, M.; MIKIKO, C.; NUSSBAUM, R.L.; DREYFUSS, G. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of *FMR1* that causes fragile X syndrome. *Cell.* 77: 33-39, 1994.
- SNOW, K.; DOUD, L.; HAGERMAN, H.; HULL, C.; HIRST, M.C.; DAVIES, K.E.; THIBODEAU, S.L. Analysis of mutations at the fragile X locus using the DNA probe Oxl.9. *Am. J. Med. Genet.* 43: 244-254, 1992.
- SNOW, K.; DOUD, L.K.; HAGERMAN, R.; PERGOLIZZI, R.G.; ERSTER, S.H.; THIBODEAU, S.N. Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 1217-1228, 1993.
- SOARES, J.F.; SIQUEIRA, A.L. Introdução à estatística médica. In: *Probabilidade e avaliação de teses diagnósticos*. Belo Horizonte: UFMG, 1999, pp 89-119.
- SOLER, M.R.; DÍAZ, A.S.; RAMOS, F.; RECASENS, M.M. Estudio de la proteína FMRP en la raíz de cabello: aplicación al diagnóstico del síndrome del cromosoma X frágil. *An Esp Pediatr.* 59: 431-435, 2003.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517, 1975.
- SCREERAM, N.; WREN, C.; BHATE, M.; ROBERTSON, P.; HUNTER, S. Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome. *British Heart Journal.* 61(3): 289-91, 1989.
- STALEY, L.W.; HULL, C.E.; MAZZOCCO, M.M.M.; THIBODEAU, S.N.; SNOW, K.; WILSON, V.L., *et al.* Molecular-clinical correlations in children and adults with fragile X syndrome. *Am J Dis Child.* 147: 723-726, 1993.
- SUDHALTER, V.; SCARBOROUGH, H.S.; COHEN, I.L. Syntactic delay and pragmatic deviance in the language of fragile X males. *Am. J. Med. Genet.* 38: 493-497, 1991.
- SUTCLIFFE, J.S.; NELSON, D.L.; ZHANG, F.; PIERETTI, M.; CASKEY, C.T.; SAXE, D.; WARREN, S.T. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1: 397-400, 1992.

- SUTHERLAND, G.R. Marker X chromosomes and mental retardation. *N. Engl. J. Med.* 296: 1415, 1977a.
- SUTHERLAND, G.R. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of culture medium. *Science.* 197: 265-266, 1977b.
- SUTHERLAND, G.R.; ASHFORTH, P.L.C. X-Linked Mental Retardation With Macroorchidism and the Fragile Site at Xq27.3 or 28. *Hum. Genet.* 48: 117-120, 1979.
- SUTHERLAND, G.R. Heritable fragile sites on human chromosomes. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am. J. Hum. Genet.* 31: 125-135, 1979a.
- SUTHERLAND, G.R. The fragile X chromosome. *Int. Rev. Cytol.* 81: 107-143, 1983.
- SUTHERLAND, G.R.; BAKER, E.; FRATINI, A. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.* 22: 433-443, 1985.
- SUTHERLAND, G.R.; LEDBETTER, D.H. Report on the committee on cytogenetic markers. *Human Gene Mapping 10: Tenth International Workshop on Human Gene Mapping.* Cytogenet. Cell. Genet. 51: 452-458, 1989.
- SUTHERLAND, G.R.; GEDEON, A.; KORNMAN, L.; DONNELLY, A.; BYARD, R.W.; MULLEY, J.C.; KREMER, E.; LYNCH, M.; PRITCHARD, M.; YU, S. RICHARDS, R.I. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 325: 1720-1722, 1991.
- SUTHERLAND, G.R.; MULLEY, J.C.; RICHARDS, R.I. Fragile X syndrome. The most common cause of familial intellectual handicap. *Med. J. Austr.* 158: 482-485, 1993.
- SUTHERLAND, G.R.; RICHARDS, R.I. Trinucleotide repeats: Fragile sites-Cytogenetic similarity with molecular diversity. *Am.J.Hum.Genet.* 64: 355, 1999.
- SUTHERLAND, G.R.; BAKER, E. Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X. *Hum. Mol. Genet.* 1: 111-113, 1992.
- SUZUMORI, K.; YAMAUCHI, M.; SEKI, N.; KONDO, I.; HORI, T. Prenatal diagnosis of a hypermethylated full fragile X mutation in chorionic villi of a male fetus. *J. Med. Genet.* 30: 785-787, 1993.
- TASSONE, F. HAGERMAN, R.J.; CHAMBERLAIN, W.D.; HAGERMAN, P.J. Transcription of the FMR-1 gene in individuals with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 97: 195-203, 2000a.
- TASSONE, F. HAGERMAN, R.J.; TAYLOR, A.K.; GANE, L.W.; GODFREY, T.E.; HAGERMAN, P.J. Elevated levels of FMR-1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 6-15, 2000b.

- THOMPSON, J.; THOMPSON, M.W. *Genética médica*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- TURNER, G.; TURNER, B. X-linked mental retardation. *J. Med. Genet.* 11: 109-113, 1974.
- TURNER, G.; EASTMAN, C.; CASEY, J.; McLEAY, A.; PROCOPIS, P.; TURNER, B. X-linked mental retardation associated with macro-orchidism. *J. Med. Genet.* 12: 367-371, 1975.
- TURNER, G.; TILL, R.; DANIEL, A. Marker X chromosomes, mental retardation and macro-orchidism. *N. Engl. J. Med.* 299: 1472, 1978.
- TURNER, G. DANIEL, A.; FROST, M. X-linked mental retardation, macro-orchidism and the Xq27 fragile site. *J. Pediatr.* 96: 837-841, 1980.
- TURNER, G. JACOBS, P. Marker (X)-linked mental retardation. In: *Harris, H. Hirschhorn, K. (eds) Advances in Human Genetics*. 1983. Vol 13. Plenum Publishing Corp, New York, USA, pp. 83-112.
- TURNER, G.; OPITZ, J.M.; BROWN, W.T.; DAVIES, K.E.; JACOBS, P.A.; JENKINS, E.C.; MIKKELSEN, M.; PARTINGTON, M.W.; SUTHERLAND, G.R. Conference report: Second International Workshop on the Fragile X and on X-linked Mental Retardation. *Am. J. Med. Genet.* 23: 11-67, 1986.
- TURNER, A.M.; ROBINSON, H.; WAKE, S. Counseling risk figures for fragile X carrier females of varying band sizes for use in predicting the likelihood of retardation in their offspring. *Am. J. Med. Genet.* 51: 458-461, 1994.
- TURNER, G.; WEBB, T.; WAKE S.; ROBINSON H. Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 64: 196-197, 1996.
- TSUI, L.C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet.* 8: 392-98, 1992.
- VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F.J.; ESKE, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; MARIMAN, E.C.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H.J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet.* 21;346(8982):1070, 1995.
- VERHELJ, C.; BAKKER, C.S.; DE GRAAFF, E.; KEULEMANS, J.; WILLEMSSEN, R.; VERKERK, A.J.M.H.; GALJAARD, H.; REUSER, A.J.J.; HOOGEVEEN, A.T.; OOSTRA, B.A. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature.* 363: 722-724, 1993.
- VERKERK, A.J.M.H.; DE GRAAFF, E. Alternative splicing in the fragile X gene *FMR1*. *Hum Mol Genet.* 2: 1348, 1993.

- VERKERK, A.J.M.H.; PIERETTI, M.; SUTCLIFFE, J.S.; FU, Y.H.; KUHL, D.P.; PIZZUTI, A.; REINER, O. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 65: 905-914, 1991.
- VERMORKEN, A.J.; WETERINGS, P.J.; SPIEREBNBURG, G.T.; VAN BENNEKOM, C.A.; WIRTZ, P.; DE BRUYN, C.H.; OEI, T.L. Fabry's disease: biochemical and histochemical studies on hair roots for carrier detection. *Br J Dermatol*. 98:191-196, 1978.
- VIANNA-MORGANTE, A.M.; ARMANDO, I.; FROTA-PESSOA, O. Letter to the Editor: Escalante Syndrome and the Marker X Chromosome. *Am. J. Med. Genet*. 12: 237-240, 1982.
- VIANNA-MORGANTE, A.M. COSTA, S.S.; PARES, A.S.; VERRESCHI, I.T. FRAXA premutation associated with premature ovarian failure. *Am. J. Med. Genet*. 64: 373-375, 1996.
- VIANNA-MORGANTE, A.M.; COSTA, S.S.; PAVANELLO, R.C.M.; OTTO, P.A.; MINGRONI-NETTO, R.C. Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile X carriers. *Genet. Mol. Biol*. 22: 471-474, 1999.
- VOELCKEL, M.A.; PHILIP, N.; PIQUET, C.; PELLISSIER, M.C.; OBERLÉ, I.; BIRG, F.; MATTEI, M.G.; MATTEI, J.F. Study of a family with a fragile site of the X chromosome at Xq27-28 without mental retardation. *Hum. Genet*. 81: 353-357, 1989.
- WALDSTEIN, G.; MIERAU, G.; AHMAD, R.; Thibodeau, S.N.; HAGERMAN, R.J.; CALDWELL, S. Fragile X syndrome: skin elastin abnormalities. *Birth Defects Orig. Art. Ser*. 23: 103-114, 1987.
- WALDSTEIN, G.; HAGERMAN, R. Aortic hypoplasia and cardiac valvular abnormalities in a boy with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 30: 83-98, 1988.
- WARREN, S.T.; SHERMAN, S.L. The fragile X syndrome. In: SCRIVER, C.R. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGRAW-HILL, 2001. p. 1257-1289.
- WEAVER, D.D.; SHERMAN, S.L. Letter to the editor: a counseling guide to the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 26: 39-44, 1987.
- WEBB, T.P.; BUNDEY, S.; THAKE, A.; TODD, J. The frequency of the fragile X chromosome among school children in conventry. *J of Med Genet*. 23: 396-9, 1986.
- WEBB, T. Delayed replication of Xq27 in individuals with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 43: 1057-1062, 1992.
- WIEGERS, A.M.; DE VRIES, L.B.A.; CURFS, L.M.G.; FRYNS, J.P. Identical psychological profile and behaviour pattern in different types of mutation in the FMR-1 region. *Clin. Genet*. 43: 326-327, 1993.

- WILLEMSSEN, R.; ANAR, B.; OTERO, Y.D.D.; DE VRIES, B.B.A.; HILHORST-HOFSTEE, Y.; SMITS, A.; LOOVEREN, E.V.; WILLEMS, P.J.; GALJAARD, H.; OOSTRA, B.A. Noninvasive Test for Fragile X Syndrome, Using Hair Root Analysis. *Am J Hum Genet.* 65: 98-103, 1999.
- WILLEMSSEN, R.; SMITS, A.; MOHKAMSING, S.; VANBEERENDONK, H.; DEHAAN, A.; DEVRIES, B.; *et al.* Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique. *Hum Genet.* 99: 308-311, 1997.
- WILLEMSSEN, R.; SMITS, A.; SEVERIJNEN, L-A.; JANSEN, M.; JACOBS, A.; BRUYN, E.; OOSTRA, B. Predictive testing for cognitive functioning in female carriers of the fragile X syndrome using hair root analysis. *Journal of Medical Genetics.* 40: 377-379, 2003.
- WISNIEWSKI, K.E.; FRENCH, J.H.; FERNANDO, S.; BROWN, W.T.; JENKINS, E.C.; FRIEDMAN, E.; HILL, A.L.; MIEZEJESKI, C.M. Fragile X syndrome: associated neurological abnormalities and development disabilities. *Ann. Neurol.* 18: 665-669, 1985.
- WITTENBERGER, M.D.; HAGERMAN, R.J.; SHERMAN, S.L.; McCONKIE-ROSSELL, A.; WELT, C.K.; REBAR, R.W.; CORRIGAN, E.C.; SIMPSON, J.L.; NELSON, L.M. The *FMRI* premutation and reproduction. *Fertility and Sterility.* 87:456-465, 2007.
- WÖHRLE, D.; HIRST, M.C. Genotype mosaicism in fragile X fetal tissues. *Hum. Genetics.* 89(1): 114-16, 1992.
- WOLFF, P.H.; GARDNER, J.; PACCIA, J.; LAPPEN, J. The Greeting Behavior of Fragile X males. *Am. J. ment. Retard.* 93: 406-411, 1989.
- YAMAUCHI, M.; NAGATA, S.; SEKI, N.; TOYAMA, Y.; HARADA, N.; NIKAWA, N.; MASUNO, I.; KAJII, T.; HORI, T. Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the dynamic mutation due to an unstable DNA sequence. *Clin. Genet.* 44: 169-172, 1993.
- YU, S.; PRITCHARD, M.; KREMER, E. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* 252(5010): 1179-81, 1991.
- YU, S.; MULLEY, J.; LOESCH, D.; TURNER, G.; DONNELLY, A.; GEDEON, A.; HILLEN, D.; KREMER, E.; LYNCH, M.; PRITCHARD, M.; SUTHERLAND, G.R.; RICHARDS, R.I. Fragile X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 968-980, 1992.
- YU, W.; WENGER, S.L.; STEELE, M.W. *X chromosome imprinting in fragile X syndrome.* *Hum. Genet.* 85: 590-594, 1990.
- ZHONG, N.; YANG, W.; DOBKIN, C.; BROWN, W.T. Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet.* 57: 351-61, 1995.

10. Anexos

ANEXO I

Soluções utilizadas nos protocolos

- **Citogenética**

Meio de cultura - RPMI

| | |
|-------------------|------|
| Meio RPMI (1640) | 80% |
| Soro fetal bovino | 15% |
| Fitohemaglutinina | 4% |
| Penicilina | 5mg |
| Estreptomicina | 10mg |
| Água estéril | 1L |

Obs: Aliquotar 9mL em garrafinhas de cultura e congelar.

Tampão Fosfato

| | |
|---|-------|
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 0,06M |
| KH ₂ PO ₄ | 0,06M |

Solução Hipotônica (KCl)

| | |
|---------------------------|--------|
| Cloreto de Potássio - KCl | 0,075M |
|---------------------------|--------|

Solução de Tripsina

| | |
|------------------|------|
| Tripsina (Sigma) | 500g |
| Água milli Q | 15mL |

Obs: Aliquotar em eppendorfs e congelar.

Solução de Timidina

| | |
|--------------|-------|
| Timidina | 15mg |
| Água milli Q | 100mL |

Obs: Aliquotar em eppendorfs e congelar.

Solução de Colchicina – 10X

| | |
|--------------|-------|
| Colchicina | 160mg |
| Água milli Q | 100mL |

Obs: Armazenar em frasco âmbar na geladeira.

Solução de Giensa

| | |
|----------------|------|
| Giensa (Merck) | 1g |
| Glicerina | 54mL |
| Metanol | 84mL |

Obs: Armazenar em frasco âmbar a temperatura ambiente.

Solução de Hank's Balance Salt Solution (HBSS) – 10X

| | |
|----------------------------------|------|
| NaCl | 80g |
| KCl | 4,0g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.5g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.6g |
| Glucose | 10g |
| Água dest. qsp | 1L |

Obs: Ajustar o pH para 8,0. Aliquotar 100mL e congelar.

Solução para uso: 20mL de HBSS + 180mL de H₂O destilada.

Solução de KOH

| | |
|----------------------|-----|
| KOH | 40g |
| Álcool comercial 99% | 1L |

- **Imuno-histoquímica**

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) - 10X

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 1,37 M |
| KCL | 27 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 100 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 20 mM |

Solução de Tris

| | |
|------|------|
| Tris | 0,1M |
|------|------|

Solução de Paraformaldeído

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Paraformaldeído | 3g |
| NaOH 10M | 50µl |
| Aquecer a 65°C, esfriar e adicionar: | |
| PBS concentrado 10x | 10mL |
| H ₂ O destilada | q.s.p. 100mL |
| Aliquotar e armazenar a -20°C | |

Solução de PBS/BSA/Glicina

| | |
|---------|-------|
| PBS | 0,1M |
| BSA | 3% |
| Glicina | 0,15% |

Solução de PBS/BSA

| | |
|-----|----|
| PBS | 1X |
| BSA | 3% |

Solução de Metanol/H₂O₂ a 30%

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Metanol | 2.100µl |
| H ₂ O ₂ 30% | 150µl |

Obs: O volume deve ser preparado em pequena quantidade para utilização imediata. O cálculo acima foi para 20 amostras.

Anticorpos e reagentes utilizados:

Anticorpo Secundário Biotinilado

“4 Link Goat Anti-Mouse Immunoglobulins. Swine Anti- Rabbit Immunoglobulins”
(DAKO[®], n° de catálogo: PL 0311 / 1089).

Conjugado APAAP com fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina

“5 Immune Complex APAAP (Alkaline Phosphatase - Antialkaline Phosphatase)”
(DAKO[®], n° de catálogo: PL0299 / 1089).

Tampão APAAP

“8 Substrate 1 APAAP Substrate Buffer – 0,1M tris” (DAKO[®], n° de catálogo: PL 0302 / 1089).

Cromógeno

“Fast Red substrate tables” (DAKO[®], n° de catálogo: PL0301/1089).

Mounting

Faramount ou ultramount, Aqueous mounting medium containing 15 mM NaN₃ (DAKO[®], n^o de catálogo: PL1021 / 1294).

Anticorpo primário monoclonal FMRP

“Mouse Anti-Fragile X Mental Retardation Protein – FMRP” (Chemicon International[®], n^o de catálogo: MAB2160) – produzido em camundongo.

Utilizado com a titulação de 1: 2.000 diluído em PBS 1X com BSA 3%.

- **Extração de DNA de sangue periférico**

Tampão de Lise de Hemácias (*Bloodlysisbuffer*) - 10X

| | |
|--------------------|--------|
| NH ₄ Cl | 82,91g |
| KHCO ₃ | 10,01g |
| EDTA 0,2M (pH7,4) | 50mL |
| Água dest. qsp | 1L |

Tampão de Lise de Núcleo (*Nucleouslysisbuffer*) - 10X

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl 1M | 10mL |
| NaCl | 23,38g |
| EDTA 0,2M (pH8,2) | 10mL |
| Água dest. qsp | 100mL |

Tampão TE

| | |
|------------------|------|
| Tris HCl (pH8.0) | 10mM |
| EDTA (pH 8.0) | 1mM |

Solução de EDTA

| | |
|-------------|------|
| EDTA pH 7.4 | 0,2M |
| EDTA pH 8.0 | 0,2M |

Obs: O pH precisa ser ajustado com NaOH

Solução de Tris

| | |
|------|----|
| Tris | 1M |
|------|----|

Obs: Ajustar o pH com HCL para 8,0.

Solução de Cloreto de Sódio

| | |
|------|----|
| NaCl | 6M |
|------|----|

Solução de Cloreto de Cálcio

| | |
|-------------------|------|
| CaCl ₂ | 0,5M |
|-------------------|------|

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

| | |
|-----|-----|
| SDS | 20% |
|-----|-----|

Solução de Glicerol 50 %

| | |
|--------------------------|------|
| Glicerol 100% | 50mL |
| H ₂ O milli Q | 50mL |

Proteinase K (10mg/mL)

Solução preparada Segundo fabricante (aliquotar e armazenar a -20°C) (Invitrogen Life Technologies[®], n° de catálogo: 25530-015)

| | |
|----------------------|---------|
| Proteínase K | 100mg |
| Tris 1M pH 7.5 | 100µL |
| Cloreto de Cálcio 1M | 500µL |
| Glicerol 50% | 9.400µL |

Enzima utilizada

Taq Platinum DNA – 5U/ µL (Invitrogen Life Technologies[®], n° de catálogo: 10966-030).

Tampão da Taq Platinum DNA (Invitrogen Life Technologies[®]).

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCL (pH 8.4) | 200mM |
| KCL | 500mM |

Oligonucleotídeos específicos

C (Integrated DNA Technologies, n° de catálogo: 16873316) – 30 nts

5' GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT 3'

F (Integrated DNA Technologies, n° de catálogo: 16873317) – 30 nts

5' AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA 3'

MTHFR F (Invitrogen Life Technologies, n° de catálogo: 10336022) – 23 nts

5' TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3'

MTHFR R (Invitrogen Life Technologies, n° de catálogo:10336022) – 20 nts

5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'

• Diluição dos Primers

Solução mãe – [] 200pmoles/μL

[Concentração] = n° de moles / volume

Solução filha - [] 20pmoles/μL

10μL do primer 200pmoles/μL + 90 μL de TE = 100 μL volume final

Soluções para eletroforese em géis de agarose

Tampão de corrida para gel de agarose - TBE (10X)

| | |
|-------------------|---------|
| Tris | 108g |
| EDTA 0,5M(pH 8.0) | 40mL |
| Ácido Bórico | 55g |
| Água dest. qsp | 1.000mL |

Tampão de Amostra para DNA (10X)

| | |
|--------------------|------------|
| Glicerol | 50% (v/v) |
| Azul de Bromofenol | 0,1% (p/v) |

Tampão de Amostra para marcador molecular (10X)

| | |
|--------------------|------------|
| Glicerol | 50% (v/v) |
| Azul de Bromofenol | 0,1% (p/v) |
| Xileno cianol | 0,1% (p/v) |

Solução de Brometo de Etídio (EtBr)

Estoque - 10mg/mL

Concentração adequada no gel é 0,5µg/mL

Gel de Agarose 2,5%

| | |
|------------------------------|-------|
| TEB 1X | 120mL |
| Agarose | 3g |
| Brometo de Etídio (0,5µg/mL) | 6µl |

Marcador de massa molecular

“100pb Ladder” (Invitrogen Life Technologies, n° de catálogo:15628-019) –
Fragmentos de DNA de 100 a 2072 pb.

- Diluição do Marcador para concentração de 0,1µg/µL

| | |
|--|-------|
| TE | 400µL |
| Tampão de amostra 10x | 50µL |
| 50% azul de bromofenol + 50% xileno cianol | |

→ Aplicação de 5µL no gel.

ANEXO II

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos UnB



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 076/2005

Título: “Diagnóstico da Síndrome do X Frágil pela análise da expressão da proteína FMRP em bulbo de cabelo entre alunos de Centro de Ensino Especial no Distrito Federal”

Pesquisador responsável: Lílian Barros Queiroz

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 04/10/2005

Proposição do(a) relator(a)

Aprovação

Aprovação com recomendação

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 15/10/2005

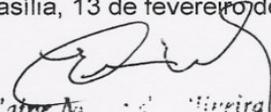
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 25/01/2006

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** em sua 1ª Reunião Ordinária de 2006, realizada no dia 25/01/2006, o projeto de pesquisa acima especificado, de acordo com o parecer do(a) relator(a), quanto aos seus aspectos éticos. Observações:

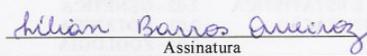
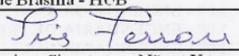
- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 13 de fevereiro de 2006.


Lílian Barros Queiroz
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina - UnB

ANEXO III

Autorização envolvendo pacientes do HUB

|  MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página no verso. | | | | |
|--|---|--|---|---|
| 1. Projeto de Pesquisa: Diagnóstico da Síndrome do X Frágil pela análise da expressão da proteína FMRP em bulbo de cabelo entre alunos de Centro de Ensino Especial no Distrito Federal | | | | |
| 2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) Genética | | 3. Código: 2.02 | 4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4) Diagnóstico | |
| 5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso) Imunologia | | 6. Código(s): 2.11 | 7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III (X) IV () Diagnóstico | |
| 8. Unitermos: (3 opções) Síndrome do X Frágil, Citogenética, Imuno-histoquímica | | | | |
| SUJEITOS DA PESQUISA | | | | |
| 9. Número de sujeitos: 100 No Centro : Total: 100 pacientes | | 10. Grupos Especiais : - 18 anos () Portador de Deficiência Mental (X) Embrião Feto () Relação de Dependência (Estudantes , Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica () | | |
| PESQUISADOR RESPONSÁVEL | | | | |
| 11. Nome: Lilian Barros Queiroz | | | | |
| 12. Identidade: 1910420 | 13. CPF.: 710.327.541-68 | 19. Endereço (Rua, n.º): SQN 215 Bloco H aptº 204 | | |
| 14. Nacionalidade: Brasileira | 15. Profissão: Biomédica | 20. CEP: 70874-080 | 21. Cidade: Brasília | 22. U.F. DF |
| 16. Maior Titulação: Graduação | 17. Cargo - | 23. Fone: 3307-2505 3272-1988 8126-5918 | 24. Fax - | |
| 18. Instituição a que pertence: UnB | | | 25. Email: Lilianqueiroz@yahoo.com.br | |
| Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: <u>11 / 09 / 2006</u> | | | | |
|  Assinatura | | | | |
| INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO | | | | |
| 26. Nome: Hospital Universitário de Brasília - HUB | | 29. Endereço (Rua, n.º): Av. L2 Norte, Qd. 604-605 | | |
| 27. Unidade Orgão: Genética Clínica |  | 30. CEP: 70.840-050 | 31. Cidade: Brasília | 32. U.F. DF |
| 28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X) | | 33. Fone: 3348-5000 | 34. Fax.: | |
| 35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional () Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil) | | | | |
| Termo de Compromisso (do responsável pela instituição) : Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução Nome: <u>Tânia Torres Rosa</u> Cargo: <u>Directora</u> Data: <u>12 / 09 / 2006</u> | | | | |
|  Assinatura Tânia Torres Rosa Hospital Universitário de Brasília Diretora | | | | |
| PATROCINADOR | | | | |
| Não se aplica (X) | | | | |
| 36. Nome: | | 39. Endereço | | |
| 37. Responsável: | | 40. CEP: | 41. Cidade: | 42. UF |
| 38. Cargo/Função: | | 43. Fone: | 44. Fax: | |
| COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP | | | | |
| 45. Data de Entrada: 04/10/2005 | 46. Registro no CEP: FM 076/2005 | 47. Conclusão: Aprovado (X) Data: 25/01/2006 | 48. Não Aprovado () Data: ___/___/___ | |
| 49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: Data: ___/___/2006 Data: ___/___/2007 | | | | |
| Encaminhamento a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação (X) 52. Data: ___/___/2006 | | 53. Coordenador Nome Assinatura | | Anexar o parecer consubstanciado |
| COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP | | | | |
| 54. Nº Expediente : | 56. Data Recebimento : | 57. Registro na CONEP: | | |
| 55. Processo : | | | | |
| 58. Observações: | | | | |

ANEXO IV

Termo de consentimento livre e esclarecido

O abaixo assinado, _____
responsável pelo paciente _____
declara ter lido e ouvido o presente termo de responsabilidade e estar informado do seguinte:

- a) Que pelo presente instrumento concorda que seu filho (a) participe da pesquisa visando a determinar a possível presença da doença chamada de síndrome do X frágil.
- b) Que esta participação implicará na retirada de aproximadamente 10 fios de cabelo. Este material será utilizado para fazer o diagnóstico, procurando pela presença ou não de elementos na raiz do cabelo que indicam se a pessoa tem a doença.
- c) Logo em seguida, serão coletados 10 mL de sangue de uma das veias do antebraço para outro tipo de exame feito rotineiramente no laboratório, a fim de confirmar os resultados e excluir falhas da reação. Este procedimento de coleta de sangue é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto, será realizado por um técnico de laboratório do Hospital Universitário – HUB.
- d) Que, resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre a doença, que poderá ser utilizado para a obtenção de benefícios sociais de direito, assim como, a orientação pedagógica em escolas especializadas;
- e) Que a recusa em deixar que seu filho (a) participe da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Brasília, ____ de _____ de 2007.

Paciente (ou responsável pelo paciente) _____

Responsável:

Lílian Barros Queiroz

Tel: 3307-2505

lilianqueiroz@unb.br

ANEXO V

Autorização para uso de imagem

Eu, _____, responsável pelo paciente
_____ autorizo a utilização de fotografias para ilustração da
pesquisa sobre a Síndrome do X Frágil, realizada pela aluna de mestrado: Lílian Barros Queiroz
sob orientação da Dra. Íris Ferrari, em pacientes atendidos no Ambulatório de Genética Médica,
do Hospital Universitário de Brasília – HUB. Estou ciente de que todos os procedimentos éticos
exigidos para um trabalho científico no homem estão sendo cumpridos.

Dados para contato:

Nome Completo:

Identidade:

Endereço para Correspondência:

Telefone para Contato:

Assinatura do responsável

Responsável pela pesquisa:

Lílian Barros Queiroz

Tel: 3307-2505

lilianqueiroz@unb.br

ANEXO VI

Tabela dos resultados de imuno-histoquímica de indivíduos controles (sadios)

| Controles | % | % | Pontuação em Cruzes | | | | | TOTAL |
|-----------|-------|-------|---------------------|---|----|-----|------|-------|
| | XF + | XF - | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | |
| AMC | 0 | 100 | | | | 2 | 7 | 9 |
| AFQ | 5,41 | 94,59 | | | 2 | 17 | 18 | 37 |
| ACPSB | 0 | 100 | - | - | - | 10 | 3 | 13 |
| ACPSB | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 14 | 15 |
| ABB | 20 | 80 | - | 1 | 1 | 4 | 4 | 10 |
| JÁ | 0 | 100 | - | - | - | 7 | 14 | 21 |
| AMC | 0 | 100 | | | | 5 | 19 | 24 |
| ACPNC | 0 | 100 | | | | 13 | 4 | 17 |
| BBG | 23,5 | 76,5 | - | 1 | 3 | 10 | 3 | 17 |
| BJBM | 0 | 100 | - | - | - | 14 | 11 | 25 |
| CCSS | 17,24 | 82,76 | | 1 | 4 | 5 | 19 | 29 |
| CF | 9,09 | 90,91 | - | - | 1 | 3 | 7 | 11 |
| CMRMF | 18,18 | 81,82 | - | | 2 | 3 | 6 | 11 |
| CAH | 0 | 100 | - | - | - | 8 | 13 | 21 |
| CESP | 0 | 100 | - | - | - | 6 | 31 | 37 |
| CFC | 12,5 | 87,5 | - | - | 3 | 8 | 13 | 24 |
| CMS | 0 | 100 | - | - | - | 13 | 26 | 39 |
| CSBG | 12,9 | 87,1 | 1 | - | 3 | 25 | 2 | 31 |
| CSB | 5,26 | 94,74 | - | - | 1 | 1 | 17 | 19 |
| CLS | 3,12 | 96,88 | - | 1 | - | 9 | 22 | 32 |
| CB | 8,34 | 91,66 | - | - | 1 | 7 | 4 | 12 |
| EBS | 3,03 | 96,97 | | | 1 | 9 | 23 | 33 |
| I | 9,52 | 90,48 | | | 2 | 8 | 11 | 21 |
| JEGR | 13,3 | 86,7 | - | 1 | 1 | 6 | 7 | 15 |
| FLSB | 0 | 100 | | | | 7 | 14 | 21 |
| FSM | 7,69 | 92,31 | | | 1 | 6 | 6 | 13 |
| MFAS | 12,5 | 87,5 | - | - | 1 | - | 7 | 8 |
| FBM | 17,14 | 82,86 | - | - | 6 | 24 | 5 | 35 |
| FBR | 11,54 | 88,46 | | 2 | 1 | 2 | 21 | 26 |
| FBNS | 0 | 100 | - | - | - | 6 | 11 | 17 |
| FCAS | 0 | 100 | - | - | - | 2 | 12 | 14 |
| GFBA | 10 | 90 | - | - | 2 | 7 | 11 | 20 |
| GBS | 4 | 96 | - | - | 1 | - | 24 | 25 |
| GSC | 0 | 100 | - | - | - | 11 | 24 | 35 |
| II | 8,33 | 91,67 | 1 | - | - | 8 | 3 | 12 |
| GOS | 0 | 100 | | | | 10 | 9 | 19 |

| | | | | | | | | |
|------|-------|-------|---|---|---|----|----|----|
| HMFB | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 7 | 8 |
| HLB | 16,67 | 83,33 | | | 3 | 4 | 11 | 18 |
| IDBA | 0 | 100 | - | - | - | 6 | 8 | 14 |
| JRCO | 0 | 100 | | | | 12 | 16 | 28 |
| JCMC | 0 | 100 | | | | 4 | 17 | 21 |
| JSL | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 20 | 21 |
| JBF | 11,76 | 88,24 | - | - | 2 | 7 | 8 | 17 |
| JABB | 4,76 | 95,24 | - | - | 1 | 6 | 14 | 21 |
| KBV | 5,26 | 94,74 | 1 | | | 8 | 10 | 19 |
| KAS | 18,18 | 81,82 | | 1 | 5 | 5 | 13 | 22 |
| KFA | 0 | 100 | - | - | - | 3 | 10 | 13 |
| KYAS | 14,29 | 85,71 | - | - | 1 | 5 | 1 | 7 |
| III | 8 | 92 | | | 2 | 10 | 13 | 25 |
| LMA | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 18 | 19 |
| LGB | 10,53 | 89,47 | | | 2 | 9 | 8 | 19 |
| LROS | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 23 | 24 |
| LFF | 15,38 | 84,62 | 1 | - | 1 | 8 | 3 | 13 |
| LRM | 0 | 100 | - | - | - | 4 | 22 | 26 |
| LBQ | 0 | 100 | - | - | - | 8 | 6 | 14 |
| LBM | 2,78 | 97,22 | | | 1 | 9 | 26 | 36 |
| LBV | 13,04 | 86,96 | - | - | 3 | 6 | 14 | 23 |
| LFQ | 0 | 100 | - | - | - | 4 | 2 | 6 |
| LVJS | 0 | 100 | - | - | - | 6 | 18 | 24 |
| MLBQ | 23,81 | 76,19 | | | 5 | 12 | 4 | 21 |
| MSCC | 0 | 100 | - | - | - | 2 | 16 | 18 |
| MLS | 0 | 100 | - | - | - | 3 | 34 | 37 |
| MTBB | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 12 | 13 |
| MVSB | 0 | 100 | | | | 9 | 12 | 21 |
| MTA | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 15 | 16 |
| MBR | 0 | 100 | | | | 3 | 19 | 22 |
| NJ | 5,56 | 94,44 | | | 2 | 14 | 20 | 36 |
| OJC | 10 | 90 | - | - | 1 | - | 9 | 10 |
| PBM | 0 | 100 | | | | 13 | 12 | 25 |
| PDB | 0 | 100 | | | | 6 | 17 | 23 |
| PAFF | 0 | 100 | | | | 6 | 9 | 15 |
| RAS | 12,9 | 87,1 | - | 1 | 3 | 13 | 14 | 31 |
| RBSB | 0 | 100 | - | - | - | 6 | 19 | 25 |
| ROB | 7,14 | 92,86 | | | 2 | 21 | 5 | 28 |
| ROB | 6,25 | 93,75 | | | 2 | 27 | 3 | 32 |
| RSB | 11,76 | 88,24 | - | - | 2 | 9 | 6 | 17 |
| RBQ | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 21 | 22 |
| RAS | 0 | 100 | | | | 18 | 21 | 39 |
| RAS | 8,33 | 91,67 | | 1 | | 4 | 7 | 12 |
| RCA | 23 | 77 | - | 2 | - | 4 | 3 | 9 |

| | | | | | | | | |
|-----|-------|-------|---|---|---|----|----|----|
| LBQ | 20 | 80 | | | 2 | 4 | 4 | 10 |
| TBF | 0 | 100 | | | | 26 | 9 | 35 |
| TBC | 25 | 75 | - | 1 | 1 | 2 | 4 | 8 |
| MLB | 5,26 | 94,74 | | | 1 | 3 | 15 | 19 |
| TOB | 18,18 | 81,82 | - | - | 4 | 17 | 1 | 22 |
| JOB | 0 | 100 | - | - | - | 1 | 9 | 10 |
| TM | 0 | 100 | | | | 4 | 15 | 19 |
| VMB | 16,7 | 83,3 | - | - | 2 | 6 | 4 | 12 |
| IV | 0 | 100 | | | | 1 | 7 | 8 |
| WFS | 0 | 100 | | | | 12 | 18 | 30 |

ANEXO VII

Resultado completo: imuno-histoquímica, molecular e citogenética

| Pacientes | RF | Bulbo | | | Molecular - PCR | | | | Citogenética |
|-----------|------|-------|-------|--------|-----------------|------|---|-------|---------------------------------|
| | | XF + | XF - | Bulbos | XF + | XF - | ? | Het-N | |
| FCL | 1910 | 25,58 | 74,42 | 43 | | | X | | 2 met de 69 analisadas (2,8%) |
| MLS | 1910 | 0 | 100 | 47 | | | X | | 2 met de 37 (5,4%) |
| KFS | 2199 | 100 | 0 | 20 | X | | | | 11 met de 78 analisadas (14,1%) |
| SAPS | 2199 | 35,71 | 64,28 | 14 | | | X | | 8 de 50 (16%) |
| DAS | 2221 | 0 | 100 | 43 | X | | | | 3 de 56 met (5,4%) |
| MGPA | 2221 | 40,91 | 59,09 | 44 | | | X | | XF(-) em 50 met |
| FHA | 2641 | 0 | 100 | 20 | | X | | | 46,XY (normal) FX (-) EM 100 |
| LHA | 2641 | 80 | 20 | 15 | | | X | | 37,14% |
| MHA | 2641 | 95,65 | 4,35 | 23 | X | | | | 5 de 30met (16,7%) |
| PHA | 2641 | 96,15 | 3,85 | 26 | | | X | | 5 de 35 met (14,2%) |
| RMT | 2641 | 30,77 | 69,23 | 26 | | | X | | 6 de 28 met (21,42%) |
| MAAT | 2903 | 7,14 | 92,86 | 14 | | | X | | XF(-) em 50 met |
| VTG | 2903 | 23,08 | 76,92 | 13 | | X | | | 9 met de 165 (15,46%) |
| MCB | 2910 | - | - | - | | X | | | 46,XY normal |
| RCB | 2910 | - | - | - | | X | | | 46,XY normal |
| SCB | 2910 | 25 | 75 | 23 | | X | | | 46,XY normal |
| SMC | 2910 | 100 | 0 | 16 | | | X | | 46,XX |
| FAS | 2914 | 0 | 100 | 53 | | X | | | 3 de 100met (3%); 46,XY,16qh+ |
| LAS | 2914 | 5,71 | 94,29 | 35 | - | - | - | - | FX(-) em 115 |
| MHFS | 2914 | 39,29 | 60,71 | 28 | | | X | | 6 de 89 met (6,7%) |
| DFDC | 2937 | 22,22 | 77,78 | 9 | | X | | | XF(-) em 100 |
| IMD | 2937 | 77,78 | 22,22 | 9 | | | | X | - |
| ARS | 2948 | 35,71 | 64,29 | 28 | | X | | | 3 em 90 - 3,3% |
| SAS | 2948 | 25 | 75 | 28 | | | X | | - |
| FLS | 3098 | 0 | 100 | 55 | | | X | | FX(-) em 50 met |
| FLF | 3098 | 3,85 | 96,15 | 26 | | X | | | 46,XY FX(-) |
| IGLS | 3098 | 11,63 | 88,37 | 43 | | X | | | FX(-) em 100 met |
| GHRG | 3197 | 9,52 | 90,48 | 21 | | X | | | 6 em 100 (6%) |
| JMRR | 3197 | 81,25 | 18,75 | 16 | | | X | | FX(-) em 60met |
| JLS | 3256 | 0 | 100 | 133 | X | | | | 10 de 100 met (10%) |
| CDC | 3309 | 11,59 | 88,41 | 69 | | | X | | 12 de 39 met (30,76%) |
| ACS | 3359 | 11,11 | 88,89 | 45 | | X | | | 46,XY FX(-) em 100 |
| ECS | 3359 | 6,9 | 93,1 | 29 | | X | | | 8 de 62 met (12,9%) |
| JPC | 3359 | 19,54 | 80,46 | 87 | | X | | | 7 de 81 met (8,6%) |
| MAC | 3359 | 10,67 | 89,33 | 75 | | | X | | 4 de 44 met (9%) |
| BOS | 3366 | 2,38 | 97,62 | 42 | | X | | | 6 de 46 met (10,86%) |
| MAP | 3366 | 8,51 | 91,49 | 47 | | | | X | XF(-) em 60 met |

| | | | | | | | | | |
|-------|------|-------|-------|----|---|---|---|---|---------------------------|
| CRB | 3416 | 10,53 | 89,47 | 38 | | | X | | XF(-) em 100 |
| GVLRB | 3416 | 100 | 0 | 32 | X | | | | 18 de 100 met (18%) |
| MVRB | 3416 | 33,33 | 66,67 | 21 | | X | | | XF (-) em 50 |
| IMSO | 3434 | 20,83 | 79,17 | 24 | | | X | | 10 de 79 met (12,65%) |
| JMSO | 3434 | 0 | 100 | 43 | | X | | | 7 de 37 met (18,9%) |
| EPOS | 3673 | 63,16 | 36,84 | 38 | | | X | | XF(-) em 66 |
| MOS | 3673 | 17,95 | 82,05 | 39 | | | X | | XF(-) em 90 |
| MRO | 3673 | 48 | 52 | 50 | | | X | | 3 de 56 met (5,4%) |
| NWRM | 3673 | 79,71 | 20,29 | 69 | | | X | | 14 de 41 met (34,1%) |
| CRL | 4010 | 8,82 | 91,18 | 34 | | | X | | - |
| LGS | 4010 | - | - | - | | X | | | - |
| TTLR | 4010 | 0 | 100 | 35 | | | X | | 5 de 45 met (11,1%) |
| KCL | 4038 | 4,84 | 95,16 | 62 | | X | | | 9 de 100 met (9%) |
| SMCCL | 4038 | 9,09 | 90,91 | 22 | | | X | | 3 de 50 met (6%) |
| RAS | 4113 | 37,5 | 62,5 | 24 | | | X | | - |
| SSN | 4113 | 28,57 | 71,43 | 21 | | | X | | 10 em 100 met (10%) |
| CS | 4128 | 50 | 50 | 2 | | | X | | XF(-) em 50 met |
| PHES | 4128 | 25 | 75 | 24 | | X | | | 5 de 45 met (11,1%) |
| AXS | 4129 | 0 | 100 | 51 | | | X | | 5 de 30 met (16,6%) |
| AS | 4129 | 0 | 100 | 34 | | X | | | FX(-) em 57 met |
| MRS | 4129 | 27,66 | 72,34 | 47 | | | X | | - |
| MRS | 4129 | 44,68 | 55,32 | 47 | | | | X | - |
| GLS | 4412 | 7,69 | 92,31 | 13 | | X | | | 14% |
| GLS | 4412 | 30 | 70 | 10 | | X | | | XF(-) |
| RL | 4412 | 100 | 0 | 12 | | | X | | 2 de 100 (2%) - normal |
| DAR | 4513 | 0 | 100 | 65 | | | X | | 6 de 50 met (12%) |
| MAS | 4513 | 100 | 0 | 47 | X | | | | 10 de 52 (19,23%) |
| SAR | 4513 | 1,43 | 98,57 | 70 | | | X | | 8 de 88 met (9,1%) |
| JVRS | 4543 | 0 | 100 | 65 | | X | | | FX(-) |
| NS | 4543 | 37,93 | 62,07 | 29 | | | X | | XF(-) |
| IFC | 4557 | 0 | 100 | 31 | | | X | | - |
| MVFA | 4557 | 0 | 100 | 13 | | X | | | FX(-) |
| APF | 4749 | 8,7 | 91,3 | 23 | | | X | | - |
| JMC | 4749 | 71,43 | 28,57 | 7 | | X | | | FX(-) |
| BNM | 4961 | - | - | - | | | X | | - |
| CNP | 4961 | 20,9 | 79,1 | 67 | | | X | | 6 de 50 metáfases (12%) |
| CNM | 4961 | - | - | - | | | X | | - |
| ENP | 4961 | - | - | - | | X | | | FX(-) em 70 |
| KCP | 4961 | - | - | - | | | X | | FX(-) em 100 met |
| LNP | 4961 | 9,81 | 90,19 | 51 | X | | | | 4 de 65 metáfases (6,15%) |
| DAOS | 4986 | 40 | 60 | 20 | | X | | | 7 em 71 met (9,6%) |
| EOS | 4986 | 30,43 | 69,57 | 23 | | | X | | - |
| MWBS | 4987 | 60,87 | 39,13 | 23 | | X | | | FX(-) |
| RSA | 4987 | 36,84 | 52,63 | 38 | | | X | | FX(-) em 100 met |

| | | | | | | | | | |
|------|------|-------|-------|----|---|---|---|---|------------------------------|
| IFJ | 5049 | 31,82 | 68,18 | 22 | | | X | | - |
| WFT | 5049 | 4,76 | 95,24 | 21 | | X | | | 5 em 58 metáfases (8,6%) |
| LFP | 5126 | 0 | 100 | 74 | | | X | | 3 de 50 met (6%) |
| LSFS | 5126 | 100 | 0 | 15 | X | | | | 7 de 50 met (14%) |
| MFO | 5126 | 100 | 0 | 49 | X | | | | 34 em 100 met (34% FX+) |
| MHP | 5126 | 7,02 | 92,98 | 57 | | | X | | 6 de 50 met (12%) |
| PFP | 5126 | 25 | 75 | 28 | | | X | | FX(-) em 55 met |
| RFO | 5126 | 100 | 0 | 17 | X | | | | 36 em 100 met (36%) |
| RFPS | 5126 | 18,75 | 81,25 | 16 | | | X | | 46,XX, FX(-) em 100 |
| TNQ | 5167 | 37,5 | 62,5 | 8 | | X | | | 46,XY XF(-) em 91 |
| EFS | 5294 | 88,89 | 11,11 | 18 | | | X | | 5 de 50 met (10%) |
| EJRS | 5294 | 100 | 0 | 33 | X | | | | 5 de 100 met (5%) |
| LRS | 5305 | 69,77 | 30,23 | 43 | | | X | | 4 de 30 met (13,3%) |
| SRS | 5305 | 93,75 | 6,25 | 16 | X | | | | 3 de 80 met (3,75%) |
| SRS | 5305 | 100 | 0 | 1 | - | - | - | - | 7 de 55 met (12,7%) |
| IBS | 5381 | 100 | 0 | 17 | X | | | | 18 de 100 met (18%) |
| ACS | 5421 | 9,8 | 90,2 | 51 | | | X | | 6 de 50 (12%) |
| RSP | 5421 | 0 | 100 | 58 | | X | | | 8 de 80 met (10%) |
| AMCS | 5428 | 25 | 75 | 4 | | X | | | 46,XY,9qh+, FX(-) em 100 met |
| JMCC | 5428 | 31,91 | 68,09 | 47 | | | X | | - |
| MVB | 5434 | 50 | 50 | 10 | | | X | | - |
| VABS | 5434 | 50 | 50 | 6 | | X | | | 46,XY - CG sem timidina |
| MJRS | 5462 | 28,57 | 71,43 | 21 | | | X | | XF(-) em 50 met |
| SVRJ | 5462 | 47,37 | 52,63 | 19 | | X | | | 46,XY, XF(-) em 85 met |
| AC | 5468 | 63,64 | 36,36 | 11 | | | X | | 46,XX (normal) xF(-) em 100 |
| JGBS | 5558 | 25 | 75 | 12 | | X | | | XF(-) em 100 |
| JVBS | 5558 | 100 | 0 | 21 | X | | | | 7 met de 50 analisadas (14%) |
| CMFS | 5611 | 100 | 0 | 44 | X | | | | 19 de 100 met (19%) |
| GLS | 5611 | 95,45 | 4,55 | 22 | X | | | | 5 de 50 met (10%) |
| MIPS | 5611 | 31,11 | 68,89 | 45 | | | X | | FX(-) em 100 met |
| MISL | 5611 | 24,39 | 75,61 | 41 | | | X | | - |
| TCSL | 5611 | 23,91 | 76,09 | 46 | | | X | | 5 de 30 met (16,6%) |
| WLS | 5611 | 100 | 0 | 22 | X | | | | - |
| FM | 5658 | 20,75 | 79,25 | 53 | | | X | | 6 de 50 met (12%) |
| JFO | 5658 | 100 | 0 | 39 | X | | | | 16 em 75 (21,3%) |
| LDV | 5675 | 0 | 100 | 30 | | X | | | FX(-) em 50 met |
| CANS | - | 29,27 | 70,73 | 41 | | | X | | 12 de 50 met (24%) |
| MNS | - | 100 | 0 | 6 | X | | | | 35 de 100 met (35%) |
| MG | - | 46,67 | 53,33 | 45 | | | X | | 10 de 100 met (10%) |
| LBS | 7989 | - | - | - | X | | | | 5 de 40 met (12,5%) |

ANEXO VIII

Quantificação dos DNA's, cálculos de pureza, concentração e diluição das amostras

| Pacientes | RF | A280 | A260 | Pureza | [] µg/mL | [] ng/mL | H ₂ O | DNA |
|-----------|------|-------|-------|--------|--------------|--------------|------------------|--------|
| FCL | 1910 | 0.315 | 0.567 | 1.8 | 2.83 | 2830 | 49,117 | 0,883 |
| MLS | 1910 | 0.149 | 0.265 | 1.78 | 1.32 | 1320 | 48,106 | 1,894 |
| KFS | 2199 | 0.114 | 0.205 | 1.79 | 1.02 | 1020 | 47,549 | 2,451 |
| SAS | 2199 | 0.227 | 0.424 | 1.86 | 2.12 | 2120 | 48,821 | 1,179 |
| DAS | 2221 | 0.121 | 0.216 | 1.78 | 1.08 | 1000 | 47,500 | 2,500 |
| MGPA | 2221 | 0.172 | 0.288 | 1.67 | 1.44 | 1440 | 48,264 | 1,736 |
| MHA | 2641 | 0.175 | 0.301 | 1.72 | 1.50 | 1500 | 48,333 | 1,667 |
| RMT | 2641 | 0.103 | 0.198 | 1.92 | 0.99 | 990 | 47,475 | 2,525 |
| LHTA | 2641 | 0.104 | 0.195 | 1.87 | 0.97 | 970 | 47,423 | 2,577 |
| PHA | 2641 | 0.081 | 0.156 | 1.92 | 0.78 | 780 | 46,795 | 3,205 |
| FHA | 2641 | 0.123 | 0.221 | 1.79 | 1.10 | 1100 | 47,727 | 2,273 |
| VTG | 2903 | 0.258 | 0.468 | 1.81 | 2.34 | 2340 | 48,932 | 1,068 |
| MAAT | 2903 | 0.640 | 0.914 | 1.43 | 4.57 | 4570 | 49,453 | 0,547 |
| SCB | 2910 | 0.038 | 0.069 | 1.8 | 0.17 | 170 | 35,294 | 14,706 |
| SMC | 2910 | 0.024 | 0.043 | 1.79 | 0.10 | 100 | 25,000 | 25,000 |
| MCB | 2910 | 0.051 | 0.083 | 1.63 | 0.255 | 255 | 40,196 | 9,804 |
| RCB | 2910 | 0.041 | 0.071 | 1.73 | 0.355 | 355 | 42,958 | 7,042 |
| AC | 2910 | 0.183 | 0.328 | 1.79 | 1.64 | 1640 | 48,476 | 1,524 |
| MHFS | 2914 | 0.091 | 0.177 | 1.94 | 0.88 | 880 | 47,159 | 2,841 |
| FAS | 2914 | 0.115 | 0.208 | 1.80 | 1.04 | 1040 | 47,596 | 2,404 |
| DFDC | 2937 | 0.173 | 0.325 | 1.87 | 1.62 | 1620 | 48,457 | 1,543 |
| IMD | 2937 | 0.124 | 0.236 | 1.90 | 1.18 | 1180 | 47,881 | 2,119 |
| AS | 2948 | 0.204 | 0.389 | 1.90 | 1.94 | 1940 | 48,711 | 1,289 |
| SAS | 2948 | 0.039 | 0.082 | 2.10 | 0.41 | 410 | 43,902 | 6,098 |
| IGLS | 3098 | 0.030 | 0.031 | 1.0 | 0.07 | 70 | 14,286 | 35,714 |
| FLS | 3098 | 0.136 | 0.258 | 1.89 | 1.29 | 1290 | 48,062 | 1,938 |
| FLF | 3098 | 0.125 | 0.239 | 1.9 | 1.195 | 1195 | 47,908 | 2,092 |
| JMRR | 3197 | 0.325 | 0.588 | 1.80 | 2.94 | 2940 | 49,150 | 0,850 |
| GHRG | 3197 | 0.097 | 0.169 | 1.74 | 0.84 | 840 | 47,024 | 2,976 |
| JLS | 3256 | 0.088 | 0.166 | 1.88 | 0.83 | 830 | 46,988 | 3,012 |
| CDC | 3309 | 0.108 | 0.220 | 2.04 | 1.1 | 1100 | 47,727 | 2,273 |
| ECS | 3359 | 0.287 | 0.363 | 1.26 | 1.81 | 1810 | 48,619 | 1,381 |
| JPC | 3359 | 0.189 | 0.353 | 1.87 | 1.76 | 1760 | 48,580 | 1,420 |
| MAC | 3359 | 0.064 | 0.115 | 1.79 | 0.57 | 570 | 45,614 | 4,386 |
| ACS | 3359 | 0.073 | 0.123 | 1.68 | 0.61 | 610 | 45,902 | 4,098 |
| MAP | 3366 | 0.191 | 0.333 | 1.74 | 1.665 | 1660 | 48,494 | 1,506 |

| | | | | | | | | |
|-------|------|-------|-------|------|-------|------|--------|--------|
| BOS | 3366 | 0.208 | 0.348 | 1.67 | 1.74 | 1740 | 48,563 | 1,437 |
| GVLRB | 3416 | 0.186 | 0.338 | 1.81 | 1.69 | 1690 | 48,521 | 1,479 |
| CRB | 3416 | 0.361 | 0.596 | 1.65 | 2.98 | 2980 | 49,161 | 0,839 |
| JMSO | 3434 | 0.393 | 0.693 | 1.76 | 3.46 | 3460 | 49,277 | 0,723 |
| IMSO | 3434 | 0.153 | 0.284 | 1.85 | 1.42 | 1420 | 48,239 | 1,761 |
| NWRM | 3673 | 0.176 | 0.317 | 1.80 | 1.58 | 1580 | 48,418 | 1,582 |
| MRO | 3673 | 0.132 | 0.240 | 1.81 | 1.2 | 1200 | 47,917 | 2,083 |
| EPOS | 3673 | 0.134 | 0.239 | 1.78 | 1.19 | 1190 | 47,899 | 2,101 |
| MOS | 3673 | 0.129 | 0.233 | 1.80 | 1.16 | 1160 | 47,845 | 2,155 |
| TTLR | 4010 | 0.158 | 0.301 | 1.90 | 1.50 | 1500 | 48,333 | 1,667 |
| LGLR | 4010 | 0.128 | 0.243 | 1.89 | 1.21 | 1210 | 47,934 | 2,066 |
| CL | 4010 | 0.046 | 0.096 | 2.08 | 0.48 | 480 | 44,792 | 5,208 |
| KCL | 4038 | 0.251 | 0.489 | 1.94 | 2.44 | 2440 | 48,975 | 1,025 |
| SMCCL | 4038 | 0.147 | 0.282 | 1.91 | 1.41 | 1410 | 48,227 | 1,773 |
| SSN | 4113 | 0.210 | 0.405 | 1.92 | 2.02 | 2020 | 48,762 | 1,238 |
| RAS | 4113 | 0.104 | 0.207 | 1.99 | 1.03 | 1030 | 47,573 | 2,427 |
| PHES | 4128 | 0.037 | 0.097 | 2.62 | 0.24 | 240 | 39,583 | 10,417 |
| CS | 4128 | 0.046 | 0.136 | 2.95 | 0.34 | 340 | 42,647 | 7,353 |
| MRS | 4129 | 0.146 | 0.294 | 2.01 | 1.47 | 1470 | 48,299 | 1,701 |
| AXS | 4129 | 0.306 | 0.570 | 1.86 | 2.85 | 2850 | 49,123 | 0,877 |
| MRS | 4129 | 0.149 | 0.294 | 1.97 | 1.47 | 1470 | 48,299 | 1,701 |
| AS | 4129 | 0.192 | 0.343 | 1.79 | 1.71 | 1710 | 48,538 | 1,462 |
| MVRB | 4158 | 0.085 | 0.150 | 1.76 | 0.75 | 750 | 46,667 | 3,333 |
| GLS | 4412 | 0.157 | 0.301 | 1.91 | 1.50 | 1500 | 48,333 | 1,667 |
| GLS | 4412 | 0.193 | 0.357 | 1.85 | 1.78 | 1780 | 48,596 | 1,404 |
| RL | 4412 | 0.189 | 0.344 | 1.82 | 1.72 | 1720 | 48,547 | 1,453 |
| SAR | 4513 | 0.104 | 0.192 | 1.85 | 0.96 | 960 | 47,396 | 2,604 |
| DAR | 4513 | 0.103 | 0.193 | 1.87 | 0.96 | 960 | 47,396 | 2,604 |
| MAS | 4513 | 0.189 | 0.346 | 1.83 | 1.73 | 1730 | 48,555 | 1,445 |
| NS | 4543 | 0.095 | 0.168 | 1.77 | 0.84 | 840 | 47,024 | 2,976 |
| JVRS | 4543 | 0.122 | 0.220 | 1.80 | 1.1 | 1100 | 47,727 | 2,273 |
| MVFA | 4557 | 0.298 | 0.574 | 1.92 | 2.87 | 2870 | 49,129 | 0,871 |
| IFC | 4557 | 0.423 | 0.758 | 1.79 | 3.79 | 3790 | 49,340 | 0,660 |
| JFO | 4749 | 0.224 | 0.426 | 1.90 | 2.13 | 2130 | 48,826 | 1,174 |
| APF | 4749 | 0.143 | 0.282 | 1.97 | 1.41 | 1410 | 48,227 | 1,773 |
| ENP | 4961 | 0.020 | 0.024 | 1.2 | 0.06 | 60 | 8,333 | 41,667 |
| LNP | 4961 | 0.144 | 0.228 | 1.58 | 1.14 | 1140 | 47,807 | 2,193 |
| CNP | 4961 | 0.171 | 0.283 | 1.65 | 1.415 | 1415 | 48,233 | 1,767 |
| CNM | 4961 | 0.403 | 0.730 | 1.81 | 3.65 | 3650 | 49,315 | 0,685 |
| BNM | 4961 | 0.254 | 0.461 | 1.81 | 2.30 | 2300 | 48,913 | 1,087 |
| KCP | 4961 | 0.166 | 0.313 | 1.88 | 1.56 | 1560 | 48,397 | 1,603 |

| | | | | | | | | |
|------|------|-------|-------|------|-------|------|--------|--------|
| DAOS | 4986 | 0.259 | 0.484 | 1.86 | 2.42 | 2420 | 48,967 | 1,033 |
| EOS | 4986 | 0.170 | 0.335 | 1.97 | 1.67 | 1670 | 48,503 | 1,497 |
| MWBS | 4987 | 0.137 | 0.255 | 1.86 | 1.27 | 1270 | 48,031 | 1,969 |
| RSA | 4987 | 0.257 | 0.485 | 1.88 | 2.42 | 2420 | 48,967 | 1,033 |
| WFT | 5049 | 0.134 | 0.265 | 1.97 | 1.32 | 1320 | 48,106 | 1,894 |
| IFJ | 5049 | 0.270 | 0.513 | 1.9 | 2.56 | 2560 | 49,023 | 0,977 |
| RFO | 5126 | 0.240 | 0.445 | 1.85 | 2.22 | 2220 | 48,874 | 1,126 |
| MFO | 5126 | 0.153 | 0.275 | 1.79 | 1.37 | 1370 | 48,175 | 1,825 |
| PPF | 5126 | 0.082 | 0.145 | 1.76 | 0.725 | 725 | 46,552 | 3,448 |
| RFPS | 5126 | 0.113 | 0.210 | 1.85 | 1.05 | 1050 | 47,619 | 2,381 |
| LSFS | 5126 | 0.123 | 0.240 | 1.95 | 1.2 | 1200 | 47,917 | 2,083 |
| MHP | 5126 | 0.236 | 0.355 | 1.50 | 1.77 | 1770 | 48,588 | 1,412 |
| LFP | 5126 | 0.101 | 0.179 | 1.78 | 0.89 | 890 | 47,191 | 2,809 |
| EFS | 5294 | 0.171 | 0.252 | 1.47 | 1.26 | 1260 | 48,016 | 1,984 |
| EJRS | 5294 | 0.126 | 0.241 | 1.91 | 1.20 | 1200 | 47,917 | 2,083 |
| SRS | 5305 | 0.112 | 0.149 | 1.33 | 0.745 | 745 | 46,644 | 3,356 |
| LRS | 5305 | 0.279 | 0.392 | 1.40 | 1.96 | 1960 | 48,724 | 1,276 |
| IBS | 5381 | 0.171 | 0.289 | 1.69 | 1.445 | 1445 | 48,270 | 1,730 |
| RSP | 5421 | 0.115 | 0.201 | 1.75 | 1.00 | 1000 | 47,500 | 2,500 |
| ACS | 5421 | 0.103 | 0.184 | 1.78 | 0.92 | 920 | 47,283 | 2,717 |
| AMCS | 5428 | 0.079 | 0.144 | 1.82 | 0.72 | 720 | 46,528 | 3,472 |
| JMCC | 5428 | 0.079 | 0.141 | 1.78 | 0.70 | 700 | 46,429 | 3,571 |
| VABS | 5434 | 0.113 | 0.217 | 1.92 | 1.08 | 1080 | 47,685 | 2,315 |
| MVB | 5434 | 0.103 | 0.212 | 2.05 | 1.06 | 1060 | 47,642 | 2,358 |
| MJRS | 5462 | 0.238 | 0.414 | 1.74 | 2.07 | 2070 | 48,792 | 1,208 |
| SVRJ | 5462 | 0.119 | 0.212 | 1.78 | 1.06 | 1060 | 47,642 | 2,358 |
| JVBS | 5558 | 0.146 | 0.257 | 1.76 | 1.285 | 1280 | 48,047 | 1,953 |
| JGBS | 5558 | 0.094 | 0.163 | 1.73 | 0.815 | 810 | 46,914 | 3,086 |
| GLS | 5611 | 0.208 | 0.373 | 1.79 | 1.86 | 1865 | 48,660 | 1,340 |
| TCSL | 5611 | 0.057 | 0.112 | 1.96 | 0.56 | 560 | 45,536 | 4,464 |
| MISL | 5611 | 0.206 | 0.388 | 1.88 | 1.94 | 1940 | 48,711 | 1,289 |
| WLS | 5611 | 0.173 | 0.314 | 1.81 | 1.57 | 1570 | 48,408 | 1,592 |
| MIPS | 5611 | 0.105 | 0.203 | 1.93 | 1.015 | 1015 | 47,537 | 2,463 |
| CMPS | 5611 | 0.129 | 0.238 | 1.84 | 1.19 | 1190 | 47,899 | 2,101 |
| FM | 5658 | 0.143 | 0.273 | 1.90 | 1.36 | 1360 | 48,162 | 1,8382 |
| JMC | 5658 | 0.326 | 0.594 | 1.82 | 2.97 | 2970 | 49,158 | 0,8418 |
| LDV | 5675 | 0.142 | 0.269 | 1.89 | 1.34 | 1340 | 48,134 | 1,866 |
| TNQ | 6522 | 0.093 | 0.185 | 1.98 | 0.92 | 920 | 47,283 | 2,717 |
| CAS | - | 0.165 | 0.303 | 1.83 | 1.51 | 1510 | 48,344 | 1,6556 |
| MSN | - | 0.181 | 0.267 | 1.47 | 1.33 | 1330 | 48,12 | 1,8797 |
| MG | - | 0.096 | 0.174 | 1.81 | 0.87 | 870 | 47,126 | 2,8736 |