MARA DELL'OSPEDALE RIBEIRO

**DO TOPO PARA A BASE: ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM
FAMÍLIAS A PARTIR DA SÍNDROME DE TREMOR/ATAXIA
ASSOCIADA AO X FRÁGIL (FXTAS)**

São Paulo

2017

MARA DELL'OSPEDALE RIBEIRO

**DO TOPO PARA A BASE: ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM
FAMÍLIAS A PARTIR DA SÍNDROME DE TREMOR/ATAXIA
ASSOCIADA AO X FRÁGIL (FXTAS)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências – Programa Mestrado
Profissional em Aconselhamento
Genético e Genômica Humana. Área de
Concentração: Biologia (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Angela M.
Vianna Morgante

São Paulo

2017

Ribeiro, Mara Dell Ospedale

Do topo para a base: aconselhamento genético em famílias a partir da síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS) / Mara Dell Ospedale Ribeiro; orientador Fernando Kok. -- São Paulo, 2017.

64 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil. 2. Gene FMR1. 3. Aconselhamento Genético. I. Kok, Fernando, orient. II. Título.

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências

Nome: RIBEIRO, Mara Dell'Ospedale

Título: Do topo para a base: aconselhamento genético em famílias a partir da síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências – Programa Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha irmã, Marcela pela parceria de toda uma vida, e a meus pais, Marlene e Milton, por serem meus exemplos e sempre me apoiarem em minhas conquistas e realizações.

AGRADECIMENTOS

Às duas famílias que participaram deste projeto, tornando-o possível.

Ao Prof. Dr. Fernando Kok, pela orientação e por acreditar na minha capacidade.

À Prof.^a Dra. Angela M V Morgante, pela coorientação e confiança.

Ao corpo docente e aos funcionários da Universidade de São Paulo, pela estrutura de ensino.

Ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, ao Laboratório de Genética Humana e ao Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, por permitirem realizar as atividades do curso de mestrado.

À equipe de Neurogenética da Faculdade de Medicina da USP, em especial a Bruno, Fernanda, Clarissa e Isabella, pelo auxílio com os pacientes e pelo grande aprendizado que me proporcionaram nos ambulatórios.

RESUMO

RIBEIRO, M. D. O. **Do topo para a base: aconselhamento genético em famílias a partir da síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS)**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em Aconselhamento Genético e Genômica Humana) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Síndrome do X frágil (SXF) é a forma mais comum de deficiência intelectual herdada. É causada por uma mutação no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), que resulta na deficiência da proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). O gene *FMR1*, localizado no braço longo do cromossomo X, em Xq27.3, possui uma repetição de trinucleotídeos (CGG)_n em sua região 5' não traduzida (região reguladora). Na população geral, o tamanho dessa repetição varia entre 5 a 44 trincas de bases. Uma expansão superior a 200 trinucleotídeos leva à hipermetilação e consequente silenciamento da transcrição do gene. Quando isso ocorre, tem-se uma mutação completa, a causa da SXF. Se a repetição expandida tem de 55 a 200 trincas de bases, chamada de pré-mutação, não ocorre hipermetilação e a proteína FMRP é produzida; portanto, a pré-mutação não está associada à SXF, porém está relacionada a outros quadros clínicos, particularmente à síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS; *Fragile-X associated Tremor Ataxia Syndrome*) e à insuficiência ovariana primária associada ao X frágil (FXPOI; *Fragile-X associated Primary Ovarian Insufficiency*). O objetivo deste trabalho foi investigar duas famílias cujos casos-índice foram encaminhados para o Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco para investigar ataxia espinocerebelar e nos quais a avaliação clínica e a história familiar sugeriram a possibilidade de FXTAS; em ambos os pacientes, pré-mutação do gene *FMR1* foi detectada. Na Família 1, foi feito o diagnóstico de SXF em um neto da propósita e foi identificada a mutação completa em várias filhas e netas, todas com dificuldade de aprendizado. Na Família 2 não foram identificadas mutações completas e em um dos netos do propósito detectou-se mosaicismos de alelo intermediário e pré-mutação. Assim, diante da variada apresentação fenotípica, a possibilidade de condição associada ao gene *FMR1* deve ser considerada frente aos fenótipos de deficiência intelectual, dificuldade de aprendizado, falência ovariana prematura e síndrome de tremor-ataxia. O diagnóstico de FXTAS em famílias em que não há registro de SXF não é frequente, provavelmente diante do desconhecimento dessa possibilidade, mas tem importância fundamental para o aconselhamento genético, particularmente quanto à ocorrência de deficiência intelectual.

Palavras-chave: Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil. Gene *FMR1*. Aconselhamento Genético.

ABSTRACT

RIBEIRO, M. D. O. **From top to bottom: genetic counseling in families ascertained through fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)** 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em Aconselhamento Genético e Genômica Humana) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Fragile X syndrome (FXS) is the most common form of inherited intellectual disability. It is caused by a mutation in the Fragile X Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene located on the long arm of the X chromosome at Xq27.3 that results in FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) deficiency. The *FMR1* gene has a trinucleotide repeat (CGG)_n at the 5' untranslated region (regulatory region); in the general population, this repeat varies in size from 5 to 44 CGG triplets. An expanded repeat of more than 200 trinucleotides leads to hypermethylation and consequent silencing of the gene transcription – the full mutation that causes FXS. The repeat containing 55 to 200 triplets characterizes a premutation; there is no hypermethylation, the gene is transcribed, and the FMRP is produced; then premutations are not associated with FXS, but are related to other clinical conditions: Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS) and Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). The objective of this study was to investigate two families whose index cases were referred to the Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco to investigate spinocerebellar ataxia, whose clinical evaluation and family history suggested the possibility of FXTAS. Both probands were found to carry *FMR1* premutations. In Family 1, the diagnosis of FXS was established in a grandson of the proband, and the full mutation was also identified in several of her daughters and granddaughters, all presenting with learning difficulties. In Family 2, no full mutations were detected; a proband's grandson had size mosaicism for *FMR1* alleles, carrying an intermediate allele and a premutation. Although uncommon, possibly due to lack of knowledge about the syndrome, the diagnosis of FXTAS in families without FXS is important for genetic counseling, particularly regarding the occurrence of intellectual disability.

Key-words: Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome. *FMR1* gene. Genetic counseling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Histórico	10
1.2 O Gene <i>FMR1</i>	11
1.3 A proteína FMRP	15
1.4 Características clínicas da síndrome do X Frágil	16
1.5 Fenótipos associados à pré-mutação do gene <i>FMR1</i>	18
1.5.1 Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS).....	19
1.5.1.1 Características da FXTAS	19
1.5.1.2 Critérios diagnósticos.....	22
1.5.1.3 Patogênese da FXTAS	24
1.5.2 Insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil (FXPOI) 26	
1.6 Testes diagnósticos	28
1.7 Aconselhamento Genético	29
2. OBJETIVOS	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
3.1 Casuística	36
3.2 Aspectos éticos.....	36
3.3 Avaliação clínica	36
3.4 Testes genéticos laboratoriais.....	37
3.4.1 Teste molecular para a síndrome do X frágil	37
3.4.2 Análise cromossômica	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Família 1 (Fig. 3).....	38
4.1.1 Propósita (Fig. 3; II-1)	38
4.1.2 Primogênita da propósita (III-1).....	42
4.1.3 Neto da propósita (IV-4).....	43
4.1.4 Demais indivíduos da família	44
4.1.5 Aconselhamento genético para a Família 1	44
4.2 Família 2 (Fig. 5).....	45
4.2.1 Propósito (Fig. 5; I-1)	45
4.2.2 Primogênita do propósito (II-1).....	47
4.2.3 Netos do propósito (III-1 e III-3)	47
4.2.4 Demais indivíduos.....	48
4.2.5 Aconselhamento genético para a Família 2	48
5. CONCLUSÕES	51

6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7.	APÊNDICE	64
7.1	Apêndice A – Teste MoCA.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Em 1943, os pesquisadores J. Purdon Martin e Julia Bell descreveram uma família em que ocorriam homens com deficiência intelectual (DI), num padrão indicativo de herança ligada ao X (Martin & Bell, 1943). Posteriormente, vários trabalhos foram publicados descrevendo famílias semelhantes, quanto ao padrão de herança da DI (Renpenning *et al.*, 1962; Opitz *et al.*, 1965; Snyder & Robinson; 1969), indicando que o cromossomo X deveria conter vários genes contribuindo para a inteligência (Lehrke, 1972). Em 1969, H. A. Lubs descreveu uma família em que a DI tinha padrão de herança ligada ao X, e os indivíduos afetados apresentavam um sítio frágil na região distal do braço longo do cromossomo X; esse cromossomo, que foi denominado X marcador, foi também detectado em algumas mulheres (Lubs, 1969). A segunda descrição do cromossomo marcador foi em uma família brasileira com DI ligada ao X (Escalante e Frota-Pessoa, 1973; Vianna-Morgante *et al.*, 1982). Estudos posteriores confirmaram a associação entre o sítio frágil no cromossomo X e DI (Giraud *et al.*, 1976; Harvey *et al.*, 1977; Sutherland, 1977a). Com a descoberta de que a manifestação do sítio frágil dependia das condições de cultura das células (Sutherland, 1977b), observou-se a associação do sítio frágil com DI, numa frequência maior do que antecipada (Sutherland & Ashforth, 1979; Howard-Peebles & Stoddard, 1980). Em 1981, Richards e col. detectaram o cromossomo X frágil na família descrita por Martin e Bell e propuseram que a síndrome associada ao sítio frágil no cromossomo X fosse denominada síndrome de Martin-Bell. A síndrome, entretanto, passou a ser conhecida como síndrome do X frágil (SXF).

Algumas famílias com DI ligada ao X, em que os afetados apresentavam macrorquidia, tinham sido descritas na época (Escalante *et al.*, 1971; Turner *et al.*, 1975; Cantú *et al.*, 1978; Bowen *et al.*, 1978).

Turner e col. (1978), utilizando condições de cultura adequadas para a manifestação do sítio frágil, detectaram o X frágil em famílias em que os indivíduos apresentavam DI associada a macrorquidia, com herança ligada ao X, concluindo que se tratava de uma única síndrome. Na família brasileira descrita por Escalante e col (1971), o cromossomo X frágil também foi detectado (Vianna-Morgante *et al.*, 1982).

Em 1991, foi possível esclarecer que a SXF é causada por mutação no gene *FMR1* (**F**ragile X **M**ental **R**etardation **1**) localizado no cromossomo X, em Xq27.3 (Verkerk *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). Essa mutação silencia o gene, levando à ausência da proteína FMRP (**F**ragile X **M**ental **R**etardation **P**rotein) (Pieretti *et al.*, 1991).

1.2 O Gene *FMR1*

O gene *FMR1* estende-se por aproximadamente 38 kb, contém 17 exons e está altamente conservado entre as espécies (Verkerk *et al.*, 1991; Oberlé *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). Possui uma repetição de trinucleotídeos (CGG)_n em sua região 5' não traduzida (região reguladora), que na população geral varia de 6 a 44 trincas, os alelos mais comuns tendo repetições de 29 e 30 trinucleotídeos (Figura 1a). Os alelos na faixa normal são estáveis quando transmitidos entre as gerações, ou seja, não há variação no número de trincas de bases da repetição (CGG)_n.

A expansão da repetição superior a 200 trincas (CGG)_n leva a sua hipermetilação e, conseqüentemente, ao silenciamento da transcrição e ausência da FMRP (Figura 1d). Quando isto ocorre, denomina-se a alteração de mutação completa, que é a causa da SXF. A mutação completa está presente em aproximadamente um em cada 4.000 a 7.000 homens e em uma em cada 8.000 a 11.000 mulheres (Hunter *et al.*, 2014).

Figura 1: O gene *FMR1*: A. Alelo normal, desmetilado e com produção de níveis normais de RNAm e proteína; B. Alelo intermediário, também desmetilado e com produção de níveis normais de RNAm e proteína; C. Alelo pré-mutado, desmetilado e com produção aumentada de RNAm e diminuída da proteína; associado a FXTAS e FXPOI; D. Mutação completa, alelo metilado, não havendo produção do RNAm e da proteína, levando à SXF. Adaptado de Santoro *et al.* (2012).

Quando o número de repetições (CGG)_n se situa entre 55 e 200 trinucleotídeos tem-se uma pré-mutação, caracterizada por ser instável na transmissão, podendo ter aumento do número de repetições de uma geração para outra (Figura 1c). Nos alelos na faixa de pré-mutação não ocorre hipermetilação, a proteína FMRP é produzida (Devys *et al.*, 1993) e não ocorrem os sinais clínicos característicos da síndrome do X frágil. No entanto, a pré-mutação foi relacionada a outros quadros clínicos, especialmente a síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS; *Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome*) e a insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil (FXPOI; *Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency*). Diversos estudos mostram também a relação entre a pré-mutação e outras condições, tais como déficit de atenção, hiperatividade e fobia social (Cornish *et al.*, 2005; Farzin *et al.*, 2006). A prevalência estimada da pré-mutação na população geral é de uma entre 150-300 mulheres e um entre 400-850 homens (Hunter *et al.*, 2014).

Há ainda uma quarta classe de alelos - intermediários ou *gray-zone*, caracterizados pela repetição no intervalo entre 45 e 54 trincas, e que podem ou não se expandir ao serem transmitidos (Figura 1b). Apesar de poderem ser instáveis, não há relato de alelos intermediários que se tenham expandido para mutação completa em uma geração (Nolin *et al.*, 2003).

Apesar de a mutação completa ser estável quando metilada nos tecidos adultos (Wöhrle *et al.*, 1993), durante a embriogênese, quando a metilação ainda não foi completamente estabelecida, as repetições podem apresentar instabilidade durante as mitoses e levar a mosaicismo quanto ao tamanho da expansão da repetição (CGG)_n (Wöhrle *et al.*, 2001): mosaicismo de mutação completa e pré-mutação (MoMP; *Mosaicism for full Mutation and Premutation*); mosaicismo de mutação completa e alelo normal (MoMN; *Mosaicism for full Mutation and Normal alleles*); mosaicismo de mutação completa, pré-mutação e alelo normal (MoMPN; *Mosaicism for full Mutation, Premutation and Normal alleles*).

Há também o mosaicismo de metilação (MoMe; *Mosaicism for Methylation*), quando o indivíduo apresenta alelo com repetições maiores

que 200 trincas que, em algumas células, está completa ou parcialmente desmetilado. Esses indivíduos podem apresentar um fenótipo moderado da SXF ou normal (homens altamente funcionais com SXF) (Hagerman *et al.*, 1994; Tassone *et al.*, 2000a).

Os processos mutacionais que levam à expansão da repetição dos alelos normais do gene *FMR1* para a mutação completa são complexos. Porém, algumas características já são bem conhecidas: não há descrição de alelos normais que tenham expandido diretamente para mutação completa e o risco de expansão da pré-mutação para mutação completa depende do tamanho da repetição (CGG)_n (Heitz *et al.*, 1992; Ashley-Koch *et al.*, 1998). No entanto, é importante ressaltar que expansões e contrações da repetição podem ocorrer mesmo em alelos normais (Finucane *et al.*, 2012).

Há também um elemento que contribui para a estabilidade da repetição: as interrupções das trincas CGG por AGG na repetição (CGG)_n. As primeiras descrições dessas interrupções foram na década de 90 (Eichler *et al.*, 1994; Kunst & Warren, 1994; Snow *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1995). Tipicamente, as interrupções AGG estão separadas por nove a 11 repetições CGG. (Eichler *et al.*, 1994). Nos alelos normais, há entre duas e quatro interrupções AGG, enquanto que a maioria das pré-mutações possuem duas interrupções ou nenhuma (Eichler *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 2000). As trincas AGG diminuem o risco de escorregamento da DNA polimerase e, portanto, de expansão (Gacy *et al.*, 1995).

Além da expansão da repetição (CGG)_n, outras variantes, incluindo mutações de ponto e deleções, já foram descritas como causa de SXF, em estudos de casos (revisão em Grønskov *et al.*, 2011). Collins *et al.* (2010a) sequenciaram o gene *FMR1* em 963 indivíduos do sexo masculino com atraso de desenvolvimento, que não tinham mutação completa; detectaram uma mutação *missense* em região conservada do gene e três mutações no promotor, estas levando a redução significativa nos níveis da proteína. Na análise do gene *FMR1*, por sequenciamento baseado em *array*, em 51 pacientes com quadro sugestivo de SXF, mas negativos para a mutação completa, Collins *et al.* (2010b) detectaram

uma deleção; concluíram que variantes de sequência no gene *FMR1* não parecem ser causa significativa de SXF, mas sugeriram que a investigação de deleções pode ser de utilidade clínica.

1.3 A proteína FMRP

Em 1993, a proteína FMRP (*Fragile Mental Retardation Protein*) foi caracterizada (Devys *et al.*, 1993, Verheij *et al.*, 1993). Hoje se sabe do seu papel na plasticidade sináptica, mecanismo importante para aprendizado e memória. A FMRP está conservada entre as espécies e, nos humanos, existem diversos sítios alternativos de *splicing*; cerca de 20 diferentes proteínas são formadas (Brackett *et al.*, 2013), sendo a proteína de 71-kDa a principal isoforma produzida (Ashley *et al.*, 1993).

A FMRP é amplamente expressa nos tecidos, principalmente em cérebro, testículos e ovários (Devys *et al.*, 1993, Hinds *et al.*, 1993; Kaufmann *et al.*, 2002). É uma proteína de ligação ao RNAm e é capaz de reconhecer tanto RNA codificadores quanto não codificadores (Ashley *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993; O'Donnel & Warren, 2002) entre estes, microRNAs (Edbauer *et al.*, 2010; Gessert *et al.*, 2010). Estima-se que a FMRP se ligue a aproximadamente 4% dos RNAm no cérebro (Ashley *et al.*, 1993). Sua principal função é no desenvolvimento e na regulação da plasticidade sináptica. Ela se localiza nos espaços pós-sinápticos das espinhas dendríticas, onde se liga e reprime a tradução de um subconjunto alvo de RNAm dendríticos; após a recepção de sinais sinápticos apropriados, a FMRP permite a síntese de proteínas chave da plasticidade sináptica. Na ausência da FMRP, há síntese excessiva de proteínas, associada ao crescimento alterado das espinhas dendríticas (Santoro *et al.*, 2012).

Estudos realizados com modelos funcionais mostraram que a FMRP penetra no núcleo onde se liga a RNAm alvos e os acompanha ao citoplasma (Eberhart *et al.*, 1996). Dentre os RNAm alvos da FMRP, 28 são de genes candidatos de transtorno do espectro autista (TEA) (Darnell *et al.*, 2011).

1.4 Características clínicas da síndrome do X Frágil

O quadro clínico dos homens com a SXF é mais grave do que o das mulheres portadoras de mutação completa, pois eles apresentam a mutação em hemizigose, enquanto as mulheres possuem um alelo para produção normal de FMRP. Indivíduos do sexo masculino com SXF apresentam deficiência intelectual de moderada a grave e frequentemente manifestam comportamento do transtorno do espectro autista (Harris *et al.*, 2008). As características comportamentais são típicas e contribuem para o diagnóstico, entre elas: déficit de atenção, hiperatividade, fala repetitiva, contato visual pobre, resistência ao contato físico e hábito de abanar e morder as mãos (Tabela 1; Hagerman *et al.*, 2002).

A SXF é a forma mais comum de deficiência intelectual herdada, e, assim, o padrão de conduta é considerar a realização do teste para a SXF em crianças que apresentam deficiência intelectual de causa desconhecida ou autismo (Garber *et al.*, 2008).

Em relação às características físicas, há grande variabilidade, principalmente em crianças pequenas. Destacam-se como características físicas: face alongada, orelhas grandes e proeminentes, palato alto, hiperextensibilidade articular, prolapso da válvula mitral, macrorquidia (após a puberdade) e pés planos (Tabela 1; Hagerman *et al.*, 2002).

Tabela 1: Características clínicas da Síndrome do X frágil

Características físicas	
Frequência >45%	
Macrorquidia (após a puberdade)	74%
Face alongada	74%
Orelhas grandes e/ou proeminentes	66%
Pés planos	65%
Hiperextensibilidade articular	64%
Palato alto	48%
Calos nas mãos	45%
Frequência <45%	
Pectus excavatum	43%
Polegares trifalângicos	41%
Prega palmar única	35%
Estrabismo	33%
Mandíbula proeminente	28%
Escoliose	20%
Características comportamentais	
Fala repetitiva	91%
Contato visual pobre	87%
Resistência ao contato físico	74%
Flapping das mãos	74%
Hiperatividade	66%
Morder as mãos	56%

Adaptada de Hagerman, 2002.

As mulheres portadoras de mutação completa apresentam, em geral, quadro clínico mais leve do que o dos homens, mas a inativação aleatória do cromossomo X pode fazer com que haja variação na gravidade do quadro clínico, e elas podem apresentar desde dificuldade de aprendizagem leve até deficiência intelectual. Estima-se que cerca de metade das mulheres com mutação completa apresentem sinais da SXF (Sherman *et al.*, 2005). Aproximadamente 71% das mulheres com mutação completa apresentam QI abaixo de 85, o que caracteriza o limite de deficiência intelectual moderada/leve (de Vries *et al.*, 1996). No entanto, aquelas com QI normal muitas vezes têm dificuldade de aprendizado significativa e/ou distúrbios psicológicos e

comportamentais. As características físicas da SXF são encontradas com menos frequência nas mulheres que nos homens, apenas 28% apresentam face alongada e mandíbula proeminente (Fryns *et al.*, 1986), cerca de 40% possuem hiperextensibilidade articular e 19% pés planos (Loesch & Hay, 1988), sendo as orelhas grandes e proeminentes a principal característica identificada nas mulheres com SXF (Hagerman *et al.*, 1992).

Estudos já associaram a SXF com epilepsia e concluíram que as crianças com SXF possuem risco aumentado de ter convulsões, documentadas em 13 a 18% dos meninos e em 5% das meninas com mutação completa (Hagerman *et al.*, 2002).

1.5 Fenótipos associados à pré-mutação do gene *FMR1*

Estudos em famílias com SXF evidenciaram a presença de sinais clínicos nos indivíduos portadores de pré-mutação diferentes daqueles encontrados nos portadores de mutação completa. As duas condições mais bem estabelecidas são a insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil (FXPOI; *Fragile-X associated Primary Ovarian Insufficiency*) e a síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS; *Fragile-X associated Tremor/Ataxia Syndrome*), que serão descritas abaixo.

Existem artigos que descrevem a manifestação de outros fenótipos clínicos nos portadores de pré-mutação que, no entanto, ainda não estão bem caracterizados: ansiedade (Bourgeois, 2011; Roberts *et al.*, 2009; Hall, 2016; Cordeiro *et al.*, 2015), transtorno obsessivo-compulsivo (Cordeiro *et al.*, 2015; Hessel *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2016), depressão (Bourgeois, 2011; Roberts *et al.*, 2009; Seritan *et al.*, 2013), doenças da tireoide (Coffey *et al.*, 2008; Winarni *et al.*, 2012; Rodriguez-Revenge *et al.*, 2009), arritmias cardíacas e hipertensão (Hamlin *et al.*, 2012, Coffey *et al.*, 2008), enxaquecas (Hall, 2016; Au, 2013), fibromialgia (Coffey *et al.*, 2008; Winarni *et al.*, 2012; Leehey *et al.*, 2011), distúrbios do sono (Chonchaiya *et al.*, 2010; Summers *et al.*,

2014), apneia do sono (Hamlin *et al.*, 2011), síndrome das pernas inquietas (Summers *et al.*, 2014) e neuropatias (Hagerman *et al.*, 2007b). Também há relato de autismo em 10% dos meninos com pré-mutação, déficit de atenção e hiperatividade (Farzin *et al.*, 2006) e nos adultos, déficit e fobia social (Cordeiro *et al.*, 2015).

1.5.1 Síndrome de tremor/ataxia associada ao X frágil (FXTAS)

A FXTAS foi identificada em 2001 pelo grupo da Dra. Randi J. Hagerman (Hagerman *et al.*, 2001), quando acompanhava famílias com SXF no *Fragile X Clinic and Research Program*, no hospital infantil em Denver, e observou o quadro de tremor progressivo, ataxia e declínio cognitivo em avôs de crianças com SXF (Hall *et al.*, 2012a).

A FXTAS é uma doença neurodegenerativa, de início tardio, progressiva e que afeta os movimentos e vem muitas vezes acompanhada de declínio cognitivo. O risco de portadores de pré-mutação apresentarem FXTAS é de cerca de 8-16%, para as mulheres e de 40-45%, para os homens (Greco *et al.*, 2008). A penetrância está relacionada ao tamanho da repetição (CGG)_n e à idade do paciente (Jacquemont *et al.* 2004b). Na faixa de pré-mutação, há um aumento de cerca de 2-8 vezes nos níveis de RNAm do gene *FMR1*, quando comparados com os níveis de RNAm na faixa do alelo normal (Tassone *et al.*, 2000b), o que, acredita-se ser tóxico para os neurônios, sendo causa da FXTAS.

1.5.1.1 Características da FXTAS

Após a primeira descrição da FXTAS diversos estudos foram conduzidos, caracterizando a síndrome (revisão em Capelli *et al.*, 2010).

Constituem características principais da FXTAS:

- a) Tremor intencional progressivo: é o tremor cinético, observado durante a realização de movimentos intencionais e que prejudica a realização de tarefas diárias como comer, escrever e segurar objetos. O tremor afeta principalmente os membros superiores

levando a incapacidade que pode ser de moderada a grave (Jacquemont *et al.*, 2003, 2004a);

- b) Ataxia da marcha: é o comprometimento da coordenação dos movimentos ao caminhar. Na FXTAS a marcha possui base alargada, os pacientes também apresentam quedas frequentes e não são capazes de realizar a marcha em *tandem* (Jacquemont *et al.*, 2004a; Rogers *et al.*, 2003);
- c) Declínio cognitivo: é observado diminuição do controle da atenção, do funcionamento executivo e do aprendizado, porém há relativa preservação da linguagem e das habilidades visuais e espaciais. Também pode ser percebida alteração de humor e de comportamento, como depressão, mudanças repentinas de humor, comportamento inadequado ou recluso, desinibição, ansiedade e demência (Jacquemont *et al.*, 2003, 2004a);
- d) Parkinsonismo: é a lentidão na realização dos movimentos que também ficam mais rígidos; observa-se o tremor de descanso, que é o tremor estático que ocorre quando se está em repouso (Jacquemont *et al.*, 2004a; Hall *et al.*, 2009);
- e) Neuropatia periférica: atinge os membros inferiores e é definida pela diminuição ou perda total dos reflexos tendinosos, redução da sensibilidade ao toque, formigamento, dor nas extremidades e fraqueza muscular na região proximal dos membros inferiores (Hagerman *et al.*, 2004, 2007b; Jacquemont *et al.*, 2004a);
- f) Disfunções autonômicas: as principais são incontinência urinária, incontinência intestinal e impotência (Jacquemont *et al.*, 2004a).

Além das manifestações clínicas, sinais radiológicos e neuropatológicos são importantes para o estabelecimento do diagnóstico. A FXTAS é classificada como uma doença da substância branca, pois em exames de imagem de ressonância magnética observa-se um padrão cerebral anormal, afetando regiões periventriculares e subcorticais cerebrais. O principal achado radiológico é a hiperintensidade do pedúnculo cerebelar médio, conhecido como sinal do Pedúnculo Cerebelar Médio (MCP; **M**iddle **C**erebellar **P**eduncle) visto em T2 (Brunberg *et al.*, 2002; Jacquemont *et al.*, 2003) e que está

presente em 60% dos homens afetados e em 13% das mulheres afetadas (Brunberg *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2007).

Outros sinais em ressonância magnética são: hiperintensidade no esplênio do corpo caloso (Hall *et al.*, 2014); hiperintensidade na ponte, ínsula e na substância branca periventricular e atrofia generalizada no cérebro e cerebelo (Muzar *et al.*, 2014a). Um estudo revelou a presença de hiperintensidade no esplênio do corpo caloso, em 50% dos pacientes com FXTAS (Apartis *et al.*, 2012). Nas mulheres, esses sinais radiológicos foram mais comuns do que o sinal de MCP, porém não são específicos de FXTAS, o que pode acabar dificultando a definição do diagnóstico.

Em 2002, Greco e colaboradores realizaram análise de amostras do cérebro de quatro idosos portadores de pré-mutação, que faleceram com sinais clínicos de FXTAS, o que resultou na primeira descrição de um novo achado neuropatológico em FXTAS: as inclusões intranucleares. Essas inclusões estavam presentes nos neurônios e nos astrócitos, no cérebro dos quatro indivíduos do estudo, bem delimitadas, eosinófilas e ubiquitino-positivas, não tendo sido encontradas nas células de Purkinje; também foi observada a formação de espongiões na substância branca profunda, o que é consistente com os achados em imagem de ressonância magnética (Greco *et al.*, 2002). Em estudo subsequente (Greco *et al.*, 2006), foi realizada a análise pós-morte de amostras de cérebro e medula espinhal, em outros 11 indivíduos com diagnóstico de FXTAS. Os resultados foram condizentes com os da pesquisa anterior, e concluiu-se que o número de inclusões intranucleares encontradas no SNC está diretamente correlacionado com o tamanho da pré-mutação; a correlação é inversamente proporcional, quando comparada a quantidade de inclusões com a idade de início de FXTAS e a idade de óbito. Um estudo, realizado em 2011 por Hunsaker e colaboradores, descreveu a formação das inclusões intranucleares em outros tecidos, entre eles, sistema nervoso periférico, músculo cardíaco, esôfago, testículos, tireoide, glândula adrenal e glândula pituitária (Hunsaker *et al.*, 2011). Esse achado ajuda a entender outros sintomas associados a

FXTAS, como arritmia cardíaca, neuropatia, hipertensão e problemas de deglutição.

As primeiras descrições de FXTAS em mulheres foram feitas em 2004 e, das quatro participantes do estudo, apenas uma apresentou as inclusões intranucleares típicas (Hagerman *et al.*, 2004). Um estudo posterior sobre os achados radiológicos nas mulheres com FXTAS revelou atrofia e doença de substância branca menos extensa do que aquelas encontradas nos homens (Adams *et al.*, 2007); mostrou também que a frequência de demência entre as mulheres com FXTAS é menor que nos homens - entre os 68 participantes do estudo (50 homens e 18 mulheres), 50% dos homens desenvolveram demência, mas nenhuma das mulheres.

Estudos mais recentes evidenciam novas características da FXTAS. Frait e col. (2014) encontraram alterações oftalmológicas, incluindo nistagmo optocinético, visão vertical prejudicada e sacadas lentas, ao examinar 19 indivíduos com FXTAS, incluindo sete mulheres. Também foi observado que dois desses pacientes apresentavam características de paralisia supranuclear progressiva (PSP), outros cinco tinham fenótipo *PSP-like*, levando à conclusão de que, provavelmente, a pré-mutação contribui para o desenvolvimento de PSP e de outras doenças do desenvolvimento. A doença de substância branca pode ocorrer em outras regiões que não a periventricular e no sinal de MCP, tendo sido relatadas alterações na base da ponte (Loesch *et al.*, 2011), no esplênio e no genu do corpo caloso (Apartis *et al.*, 2012) e na ínsula (Hagerman & Hagerman, 2013). Foi observado que a hiperintensidade do corpo caloso está presente em aproximadamente 50% dos indivíduos com FXTAS (Apartis *et al.*, 2012).

1.5.1.2 Critérios diagnósticos

Jacquemont e et al. (2003) estabeleceram critérios diagnósticos para FXTAS. Eles propuseram três categorias de diagnóstico: “definitivo”,

“provável” e “possível”, cada classe caracterizada pela combinação de sinais e sintomas clínicos, radiológicos e patológicos.

Os sinais e sintomas clínicos e radiológicos foram classificados como “principais” e “secundários”. Assim, na categoria de diagnóstico “definitivo” é necessária a presença de um sinal radiológico principal e um sinal clínico principal ou um sinal clínico principal e a presença de inclusões intranucleares (pós-morte); na categoria “provável”, devem estar presentes um sinal radiológico principal e um sinal clínico secundário ou dois sinais clínicos principais; já na categoria “possível” é essencial a presença de um sinal clínico principal e um sinal radiológico secundário (Tabela 2; pág. 24).

A presença de pré-mutação no gene *FMR1* é exigência para se estabelecer o diagnóstico de FXTAS, pois é ela quem diferencia a FXTAS de outras doenças neurodegenerativas idiopáticas. No entanto, a FXTAS já foi diagnosticada em pacientes portadores de alelo intermediário (Hall *et al.*, 2012b), em indivíduos com a mutação completa, não metilada e em indivíduos com mosaicismo de tamanho de alelos de *FMR1* (Loesch *et al.*, 2012). Esses casos, em que a expansão da repetição (CGG)_n não está nos limites de pré-mutação, levou à inclusão, nos critérios diagnósticos, de alelos intermediários e de mutação completa não metilada, em que há aumento na expressão do RNAm do *FMR1* (Hall *et al.*, 2014).

Tabela 2: Critérios diagnóstico para FXTAS

Critérios		
Diagnóstico	Definitivo	Um sinal clínico principal + um sinal radiológico principal Um sinal clínico principal + inclusões intranucleares (pós-morte)
	Provável	Dois sinais clínicos principais Um sinal clínico secundário + um sinal clínico radiológico principal
	Possível	Um sinal clínico principal + um sinal radiológico secundário
Sinais e sintomas		
Clínico	Principal	Tremor intencional e ataxia cerebelar
	Secundário	Parkinsonismo, déficit moderado a severo na memória de curto prazo e déficit na função executiva
Radiológico	Principal	RM: lesões na substância branca no pedúnculo cerebelar médio (sinal MCP)
	Secundário	RM: lesões na substância branca cerebral, atrofia cerebral generalizada de moderada a grave

Adaptado de Capelli *et al.*, 2010

1.5.1.3 Patogênese da FXTAS

A patogênese da FXTAS ainda não foi bem estabelecida, porém vários mecanismos foram propostos baseados nos elevados níveis de RNAm associados à pré-mutação, todos eles envolvendo ganho de função tóxico do RNAm.

O primeiro mecanismo proposto propõe a ligação aumentada de proteínas à repetição (CGG)_n expandida, bloqueando as funções celulares normais dessas proteínas (Hagerman, 2012). Esse modelo é baseado no paradigma da distrofia miotônica, em que a expansão da repetição CUG na 3'UTR no RNAm do gene *DMPK* sequestra um modulador de *splicing*, bloqueando seu papel e levando, assim, à distrofia miotônica 1 (doença de Steinert) (Timchenko, 2013). Já na FXTAS, ainda não se sabe com clareza quais proteínas são sequestradas, mas há algumas candidatas, com base na evidência da

ligação ao RNA com a expansão, *in vitro* e *in vivo* (Hagerman & Hagerman, 2016): hnRNP A2/B1; pur α ; Sam68; e DGCR8-Drosha, associada, quando sequestrada, a diminuição dos níveis de vários microRNA e o consequente aumento de seus precursores, nos tecidos cerebrais de indivíduos com FXTAS (Sellier *et al.*, 2013).

O segundo modelo envolve a tradução do RNAm do *FMR1* de um ponto antes do códon de início AUG, conhecida como tradução não AUG associada a repetições, ou tradução RAN (**Repeat-Associated Non-AUG**). Esse mecanismo já foi associado a outras doenças de expansão de trinucleotídeos, como a ataxia espinocerebelar tipo 8, a distrofia miotônica 1 e a esclerose lateral amiotrófica/demência frontotemporal associada a *C9orf72* (Cleary & Ranum, 2013). Estudos indicam que a tradução RAN do gene *FMR1* leva à síntese de um produto atípico que não é produzido pela tradução iniciando em AUG, o peptídeo FRMpolyG, que contém uma sequência de poliglicina, como resultado da tradução ao longo da repetição CGG, e é tóxico para as células (Todd *et al.*, 2013). FRMpolyG se encontra nos mesmos locais, em que há inclusões de FXTAS, tendo sido identificada no sistema nervoso central e em outros órgãos, em que se observam também as inclusões, como coração, tireoide e glândula adrenal (Buijsen *et al.*, 2014).

O terceiro modelo proposto, diferentemente dos anteriores, envolve evento durante a transcrição através da região 5'UTR do gene *FMR1*, rica em CG, favorecendo a formação de alças R. Essas alças normalmente têm papel de proteção contra a metilação das ilhas CpG de promotores (Roy & Lieber, 2009); entretanto, a formação excessiva dessas alças pode levar à ativação da resposta a dano de DNA, resultando em instabilidade genômica. Loomis *et al.* (2014) mostraram que, no caso do *FMR1*, a frequência e a complexidade estrutural das alças R aumentam com o tamanho da repetição (CGG)_n e com o nível de expressão do gene; concluíram que essa característica molecular do gene *FMR1* está provavelmente associada com disfunções celulares.

Hagerman & Hagerman (2016) consideram possível que esses três mecanismos estejam envolvidos na patogênese de FXTAS, porém elucidar qual o papel de cada um é importante para que possam ser

desenvolvidas terapias, que teriam bases diferentes de acordo com cada um dos modelos.

Há também a possibilidade de que toxinas exógenas possam agravar ou até mesmo adiantar o início dos sintomas da FXTAS. Um estudo de 2005 descreveu uma mulher que, ao fazer tratamento quimioterápico para câncer de mama, apresentou piora no quadro de FXTAS (O'Dwyer *et al.*, 2005). O principal fator externo que vem sendo associado à piora dos sinais de FXTAS é o consumo prolongado de álcool e opióides (Muzar *et al.*, 2014b). O indivíduo mais jovem com FXTAS foi descrito por Martínez-Cerdeño *et al.* (2015): um homem de aproximadamente 30 anos de idade com longo histórico de uso de drogas e álcool, que possuía pré-mutação com repetição (CGG)₈₈; após sua morte por trauma, aos 36 anos, a análise do cérebro mostrou a presença das inclusões intranucleares típicas da FXTAS (Martínez-Cerdeño *et al.*, 2015).

Existem trabalhos na literatura que relacionam o tamanho da repetição CGG com o grau e o tipo de comprometimento e também com a idade de início da FXTAS. Jacquemont *et al.* (2004b) descreveram forte correlação entre o risco de desenvolver FXTAS e o aumento da idade, e também mostraram que o risco é maior para os indivíduos do sexo masculino. Em um estudo subsequente, Jacquemont *et al.* (2006) relacionaram a ocorrência de FXTAS com o tamanho da repetição (CGG)_n e sugeriram que indivíduos portadores de pré-mutação com repetição (CGG)_{<70}, quando apresentam FXTAS, as manifestações são leves ou atípicas. Tassone *et al.* (2007) relacionaram a idade de início de FXTAS com o tamanho da repetição.

1.5.2 Insuficiência ovariana prematura associada ao X frágil (FXPOI)

A insuficiência ovariana prematura (POF; **Premature Ovarian Failure**) é caracterizada pela cessação da menstruação antes dos 40 anos de idade, em decorrência de falência ovariana, e afeta cerca de 1% das mulheres da população geral. As causas da POF podem ser genéticas

ou ambientais (Anasti, 1998), porém cerca de 60% dos casos de POF não têm causa definida (Murray *et al.*, 1998).

Os primeiros relatos de maior incidência de POF entre as portadoras da pré-mutação do X frágil ocorreram ainda na década de 1990 (Cronister *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1994; Partington *et al.*, 1996; Vianna-Morgante *et al.*, 1996). Hoje sabe-se que FXPOI (**F**ragile **X**-associated **P**rimary **O**vary **I**nsuficiency) afeta 21% das mulheres portadoras da pré-mutação (Allingham-Hawkins *et al.*, 1999; Vianna-Morgante *et al.*, 1999; Sherman, 2000). Além disso, as portadoras de pré-mutação entram em menopausa aproximadamente 5 anos antes do que as mulheres da população geral (Murray *et al.*, 2000). Outras manifestações clínicas da FXPOI podem incluir alterações nos ciclos menstruais, subfertilidade, aumento na taxa de gêmeos dizigóticos, aumento da frequência de aneuploidia na prole e de abortos espontâneos (te Velde & Pearson, 2002).

O ganho de função do RNAm aparece também como mecanismo envolvido na FXPOI. Ausência ou diminuição dos níveis de proteína, decorrentes da mutação completa, não devem ser fatores de predisposição uma vez que portadoras de mutação completa não apresentam risco aumentado de terem menopausa precoce (Cronister *et al.*, 1991 e Schwartz *et al.*, 1994). O estudo realizado por Chang *et al.* (2011) evidenciou a presença das inclusões intranucleares características de FXTAS nas células de ovários de mulheres com pré-mutação, levantando a hipótese de que o mecanismo molecular envolvido na FXPOI seja semelhante ao da FXTAS, e que as traduções RAN também ocorram nas mulheres com FXPOI (Buijsen *et al.*, 2016).

O tamanho da repetição (CGG)_n no gene *FMR1* está associado com a idade do início da menopausa de forma não linear. A faixa entre as pré-mutações com repetições de 80 e 100 trincas de bases é a que confere maior risco para o desenvolvimento de FXPOI e para manifestação em idade mais precoce. Quando a repetição possui mais de 100 trincas CGG, o risco permanece maior do que o das mulheres da população geral, porém é menor do que aquele das portadoras de pré-

mutação na faixa de tamanho da repetição entre 80 e 100 trincas de bases (Sullivan *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2007).

1.6 Testes diagnósticos

Estabelecida a associação do sítio frágil do cromossomo X (FRAXA) com a síndrome do X frágil, o exame cromossômico, utilizando indutores do sítio frágil, passou a ser o teste diagnóstico indicado para a investigação da deficiência intelectual de causa desconhecida, especialmente em pessoas do sexo masculino (Jacky *et al.*, 1991). Apesar do exame cromossômico se mostrar eficiente para o diagnóstico de meninos com SXF, as meninas com deficiência intelectual, nas famílias de afetados, frequentemente não manifestavam o sítio frágil; da mesma forma, indivíduos clinicamente normais, portadores certos, do gene alterado (depois identificados majoritariamente como portadores de pré-mutação) não expressavam o FRAXA.

Com a identificação do gene *FMR1* em 1991 e o esclarecimento dos mecanismos que levam à SXF, foi possível o desenvolvimento de testes moleculares capazes de reconhecer tanto a mutação completa quanto a pré-mutação, em ambos os sexos. Logo o exame cromossômico foi substituído pela análise do gene *FMR1*, como teste diagnóstico para a SXF. Durante muitos anos, o teste molecular adotado foi o *Southern blotting*, em que uma sonda correspondente a uma região do gene *FMR1* é hibridada ao DNA genômico. Essa técnica permite reconhecer os alelos normais, os alelos pré-mutados e aqueles com mutação completa, mas não é capaz de identificar o número de trincas da repetição. A amplificação da repetição (CGG)_n pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR; **Polimerase Chain Reaction**) permite a definição do número de trincas de base; entretanto, até que a técnica fosse definida como padrão ouro para a análise do gene *FMR1*, foi preciso aprimorá-la, para que fosse possível realizar a amplificação de grandes segmentos ricos em CG, e o diagnóstico de mulheres heterozigóticas. Hoje já existem testes de PCR que permitem determinar

tanto o tamanho da repetição quanto o status da metilação na região, com a identificação do espectro de alelos do *FMR1* (Filipovic-Sadic *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Atualmente, kits comerciais diagnósticos dos alelos do *FMR1* estão disponíveis.

Existe a possibilidade de realizar o teste pré-natal para a SXF, por meio da análise do gene *FMR1* em DNA extraído de vilosidade coriônica ou de células do líquido amniótico, no início da gravidez (Monaghan *et al.*, 2013; Biancalana *et al.*, 2015). Já é possível também realizar o diagnóstico pré-implantacional da SXF. Para isso é necessário realizar a fertilização *in vitro* e a retirada de blastômeros para a análise do gene *FMR1*, com a implantação de embriões selecionados. Para assegurar o resultado, é realizada ainda a análise de locos polimórficos ligados ao gene *FMR1* e a avaliação de marcadores para identificação do sexo do embrião (Chen *et al.*, 2016).

1.7 Aconselhamento Genético

A SXF tem padrão de herança ligado ao X e é sempre herdada. Na maioria das vezes, a mãe do afetado possui uma pré-mutação que, ao ser transmitida, sofre expansão da repetição (CGG)_n, podendo manter-se ainda como pré-mutação ou ultrapassar as 200 trincas de bases e se tornar uma mutação completa (Fig. 2A). Quando o portador de pré-mutação é um homem, praticamente na totalidade dos casos, não ocorre expansão da repetição para mutação completa na transmissão para suas filhas que, assim, são todas portadoras de pré-mutação (Fig. 2C). Nas famílias com afetados pela SXF, o risco empírico para as portadoras de pré-mutação de terem filhos afetados é de 30%, já esse risco para portadoras de mutação completa é de aproximadamente 40% (Fig. 2B).

Figura 2: Herança do gene *FMR1*

A probabilidade de expansão de pré-mutação para mutação completa depende do tamanho da repetição $(CGG)_n$ (Tabela 3). Nolin *et al.* (2003) analisaram a transmissão de alelos pré-mutados e intermediários por mulheres. Nesse estudo, foram investigadas amostras de 13 laboratórios de oito países. O menor alelo pré-mutado que expandiu para mutação completa em uma única geração, presente em duas mulheres, tinha $(CGG)_{59}$ e não possuía interrupção AGG. A comparação entre fetos masculinos e femininos não revelou diferença quanto à probabilidade de possuírem expansão para mutação completa. Adicionalmente, foi

comparada a transmissão de alelos intermediários pelas mulheres, em famílias com e sem histórico de SXF, e, quando não havia SXF, os alelos foram mais estáveis ao serem transmitidos, a instabilidade aumentando com o tamanho da repetição.

Tabela 3: Risco de expansão da repetição (CGG)_n para mutação completa, de acordo com o tamanho, na transmissão de pré-mutação por mulheres

Tamanho da repetição (CGG)_n materna	Risco de expansão para a mutação completa
55-59	3,7%
60-69	5,3%
70-79	31,1%
80-89	57,8%
90-99	80,1%
>100	94-100%

Adaptado de Nolin *et al.*, 2003

Apesar de a pré-mutação não se expandir para mutação completa na transmissão pelo homem portador, existem dois relatos na literatura de meninas portadoras de mosaicismo de pré-mutação e mutação completa, e pais portadores de pré-mutação. Zeesman *et al.* (2004) descreveram uma menina com atraso de desenvolvimento, portadora de pré-mutação e de mutação completa; seu pai apresentava o mesmo mosaicismo no sangue periférico, tendo a mutação completa parcialmente metilada; em espermatozoides, observou-se mosaicismo de tamanho de alelos pré-mutados. Alvarez-Mora *et al.* (2017) descreveram mosaicismo de alelos (CGG)₁₇₅/(CGG)_{>200} em uma menina cujo pai era portador de alelo pré-mutado – (CGG)₈₈, em sangue periférico e (CGG)₁₃₄, em espermatozóides; a peculiaridade desse alelo instável era sua repetição (CGG)_n não possuir interrupções AGG, fator que contribui para a instabilidade da repetição (Nolin *et al.*, 2014). Nos dois casos, a pré-mutação transmitida via espermatozoide deve ter-se expandido para mutação completa durante o desenvolvimento. Esses relatos de situação rara alertam para a possibilidade de alelos pré-mutados altamente instáveis, que podem expandir-se para mutação completa, quando herdados via paterna.

O diagnóstico de crianças afetadas pela SXF é importante para alertar os pais sobre a possibilidade de recorrência e também para a identificação de familiares, particularmente mulheres, que possam ser portadoras de pré-mutação ou de mutação completa, para oferecer-lhes testes e aconselhamento genético.

Com o avanço dos estudos das doenças de manifestação tardia associadas ao gene *FMR1*, é importante ressaltar que identificar uma pré-mutação em indivíduos clinicamente normais é preditivo para FXTAS, e também para FXPOI em mulheres. As implicações desses diagnósticos devem ser bem esclarecidas durante o aconselhamento genético pré-teste.

Por se tratarem de doenças genéticas com herança e mecanismo genético complexos, e o teste para SXF ser um dos testes genéticos mais frequentemente realizados, organizações envolvidas com a prática genética formularam documentos com os padrões e diretrizes para o teste do gene *FMR1*, tanto para a SXF quanto para as outras doenças associadas ao gene *FMR1*. O primeiro, publicado em 2001, pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), marcou o início de uma série a tratar de doenças específicas (Maddalena *et al.*, 2001); o documento teve sua última atualização publicada em 2013 (Monaghan *et al.*, 2013). Há também uma publicação da *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN) (Biancalana *et al.*, 2015). Tanto as publicações da ACMG quanto da EMQN trazem considerações a respeito dos diferentes testes genéticos disponíveis para a análise do gene *FMR1* e quais informações devem constar nos laudos emitidos aos pacientes, e são direcionados a profissionais da área da genética e laboratórios.

A *National Society of Genetic Counselors* (NSGC) também publicou suas orientações a respeito das doenças associadas ao gene *FMR1* (Finucane *et al.*, 2012), no entanto, com foco maior no aconselhamento genético, pré-teste e pós-teste, e voltado para profissionais que realizam o aconselhamento genético. Dentre as orientações do pré-teste é levantado o fato de que poucos profissionais da área estão familiarizados com FXTAS e FXPOI e muitos subestimam sua pesquisa

em famílias que podem estar em risco para a SXF; um ponto essencial salientado é a construção de heredograma da família, com atenção para a diversidade de sinais clínicos que podem estar relacionados ao *FMR1*. O papel dos aconselheiros genéticos é fundamental para fornecer informações pré-teste e preparar os indivíduos para os possíveis resultados. As orientações relativas às doenças associadas ao gene *FMR1* estão sumarizadas a seguir.

a) Considerações gerais:

- avaliar o conhecimento dos indivíduos sobre as doenças associadas ao gene *FMR1*;
- discutir as implicações da detecção de alelos pré-mutados, intermediários e com mutação completa;
- levantar as opções de acompanhamento pós-teste;
- discutir as reações emocionais e efeitos dos possíveis resultados.

b) Para os pacientes encaminhados com história conhecida na família de doenças associadas ao gene *FMR1*:

- colher as experiências dos pacientes com os familiares, incluindo posturas em relação à deficiência;
- avaliar a autopercepção do risco genético;
- utilizar o histórico familiar para exemplificar os padrões de herança;
- se adequado, incluir na discussão do aconselhamento genético as crianças em risco;
- levantar benefícios e malefícios de se testarem crianças e adolescentes pré-sintomáticos em risco.

c) Para adultos encaminhados com comprometimento cognitivo e/ou comportamental:

- identificar os sinais neurológicos da SXF ou da FXTAS que podem afetar a compreensão e a decisão do paciente;
- verificar o estado de tutela do paciente antes do teste, se apropriado;

- incluir membros da família ou cuidadores na discussão, com a permissão do paciente;
- acessar recursos de trabalho jurídico e social para questões relativas a competência e consentimento informado para testes genéticos.

d) Para testes pré-natais:

- alertar a paciente que um posterior teste de amniocentese pode ser necessário para esclarecer o resultado do teste em vilosidade coriônica.

Deve-se ressaltar, para os indivíduos com resultado negativo do teste para mutações no gene *FMR1*, que outras alterações genéticas não ficam excluídas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar duas famílias cujos casos índice foram encaminhados para o Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL), do Instituto de Biociências da USP, para pesquisa de ataxia espinocerebelar e nas quais a avaliação clínica e a história familiar indicaram a possibilidade diagnóstica de FXTAS. A identificação de pré-mutação do gene *FMR1* nessas pessoas permitiu confirmar o diagnóstico.

Os objetivos específicos incluíram oferecer avaliação clínica, teste do gene *FMR1* e aconselhamento genético aos indivíduos das famílias que assim o desejaram, permitindo esclarecer a causa de condições como falência ovariana prematura, deficiência intelectual e dificuldade de aprendizado.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram estudadas duas famílias averiguadas por dois indivíduos encaminhados ao CEGH-CEL para realizar testes moleculares, pois apresentavam hipótese diagnóstica de ataxia espinocerebelar. Após avaliação clínica, história familiar detalhada com construção dos heredogramas e revisão de exames de imagem, a hipótese diagnóstica levantada para os casos índice foi de FXTAS.

3.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Biociências (IB-USP) (CAAE: 69239117.1.0000.5464).

Os pacientes ou seus responsáveis foram informados dos objetivos do projeto e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3 Avaliação clínica

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pela equipe do Ambulatório de Neurogenética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para a avaliação do desempenho cognitivo, foi utilizado o Montreal Cognitive Assessment – MoCA (Apêndice A)

3.4 Testes genéticos laboratoriais

Os testes moleculares para X frágil e a análise cromossômica foram realizados no Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP.

3.4.1 Teste molecular para a síndrome do X frágil

A extração do DNA de linfócitos do sangue periférico foi realizada automaticamente, utilizando o aparelho Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, USA).

O número de trincas de bases da repetição (CGG)_n do gene *FMR1* foi determinado por PCR, usando os reagentes AmplideX® *FMR1* PCR ou AmplideX® *FMR1* mPCR (Asuragen), e eletroforese capilar (analisador genético ABI 3700; Applied Biosystems, USA).

3.4.2 Análise cromossômica

Para o estudo cromossômico, as preparações foram obtidas a partir de cultura temporária de linfócitos de sangue periférico. A análise foi realizada após bandamento G.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Família 1 (Fig. 3)

Figura 3: Heredograma da Família 1

4.1.1 Propósita (Fig. 3; II-1)

A propósita, uma mulher de 81 anos, em consulta no CEGH-CEL, relatou dificuldade para caminhar, de caráter progressivo, iniciando cerca de 10 anos antes; andava naquele momento somente com apoio, quadro este associado a disartria. Negou dificuldade para segurar objetos ou tremores.

Ao exame neurológico observou-se claro declínio cognitivo: a fluência verbal estava reduzida, não conseguiu nomear objetos nem fazer contas. Caminhou com marcha de pequenos passos, desequilibrando-se com facilidade.

Filha única com ensino superior completo, seu pai faleceu aos 30 anos de idade, sem causa conhecida. Sua mãe apresentou menopausa precoce, com aproximadamente 35 anos; foi relatado que, em idade avançada, apresentou dificuldades motoras e declínio cognitivo, tendo recebido diagnóstico de doença de Alzheimer; faleceu com cerca de 90 anos. A propósita teve oito filhos (sete do sexo feminino e um, do masculino) e quatro de suas filhas tiveram dificuldade de aprendizado (III-1, 2, 3 e 5); para uma delas (III-1) foi relatado ter quadro similar ao da mãe, com início aos 50 anos, andando com dificuldade. Foi também relatada deficiência intelectual em neto (IV-4).

A ressonância magnética de crânio revelou atrofia significativa de cerebelo e leucopatia, afetando a região frontal.

Levando em consideração o quadro clínico, a imagem de ressonância magnética de crânio e a história familiar de menopausa precoce, dificuldade de aprendizado e deficiência intelectual, foi levantada para a propósita a hipótese diagnóstica de FXTAS.

A análise do gene *FMR1* mostrou que a propósita é heterozigótica quanto a uma pré-mutação do gene *FMR1*, tendo o alelo pré-mutado 112 trincas de bases - (CGG)₁₁₂, e o alelo normal, (CGG)₃₃ (Tabela 4; pág. 44). Foi feita nova avaliação clínica e realizado teste neurocognitivo, considerando os critérios diagnósticos de FXTAS. (Tabela 2; pág. 24)

A reavaliação neurológica, realizada um ano após a primeira consulta mostrou:

- a) Ataxia de predomínio axial e apendicular de membros inferiores;
- b) Declínio cognitivo de moderado a grave, desatenção e perseveração (comprometimento do Digit Span direto e inverso, Luria, Ozeretzki e teste do aplauso comprometidos). O desempenho no teste de triagem Montreal Cognitive Assessment (MoCA) foi de 6/30;
- c) Tremor de repouso e de ação, simétrico e bilateral;
- d) Sinais de frontalização caracterizado por presença de grasping e groping e reflexos axiais da face exaltados;

- e) Disartria, com fluência verbal fonêmica e semântica diminuídas e compressão preservada;
- f) Apraxia para imitação de gestos, da mímica de uso de objetos únicos e multitarefas;
- g) Força muscular conservada, grau IV, bilateralmente;
- h) Bradicinesia, com paratonia inibitória;
- i) Marcha realizada apenas com apoio, com passos curtos;
- j) Nistagmo optocinético alterado.

A ressonância magnética de encéfalo realizada em julho de 2014 revelou atrofia cerebral e de cerebelo e leucoencefalopatia frontal (Figura 4).

Portanto, segundo os critérios diagnósticos para FXTAS, a propósito preenchia critérios de provável FXTAS, pois apresentava dois sinais clínicos principais, o tremor intencional e a ataxia cerebelar, além de sinais radiológicos secundários - lesões na substância branca cerebral e atrofia cerebral generalizada.

Figura 4: Imagem de ressonância magnética de crânio da propósita (II-1): A. Sequência axial FLAIR. Atrofia cerebelar (seta); B. Sequência axial FLAIR. Leucoencefalopatia de predomínio frontal; C. Sequência sagital ponderada em T1. Acentuada atrofia cerebelar.

4.1.2 Primogênita da propósita (III-1)

Foi realizada avaliação clínica e teste neurocognitivo na primogênita da propósita (Fig. 3; III-1), pois foi relatado que ela apresentava quadro semelhante ao de sua mãe.

Com 59 anos de idade e ensino médio completo, sempre apresentou dificuldades no relacionamento interpessoal e para tomar decisões que envolvessem finanças, autocuidado e gestão da família e do domicílio. Seu relacionamento com a família e com o esposo era turbulento e marcado algumas vezes por violência.

Nos últimos quatro anos, algumas dessas características tornaram-se mais evidentes e, adicionalmente, a paciente passou a ter dificuldade para falar, com discurso empobrecido e lacônico. Mostrava-se apática e seu maior interesse era assistir televisão. Deixou de ter autonomia para as atividades da vida diária.

A avaliação neurológica mostrou:

- a) Desempenho cognitivo no teste de triagem Montreal Cognitive Assessment (MoCA) foi de 14/30;
- b) Fluência verbal fonêmica e semântica comprometida;
- c) Apraxia para imitação de gestos, da mímica de uso de objetos únicos e multitarefas;
- d) Força muscular conservada, grau IV, bilateralmente;
- e) Disartria e ataxia cerebelar discreta, de predomínio axial, com dismetria de MMSS e MMII. Não apresentava tremor.

Não foi possível realizar estudos de imagem em decorrência de sua baixa adesão a recomendações médicas.

Assim, foi possível caracterizar que ela apresentava disfunção executiva com impacto na sua capacidade de tomar decisões, e seu desempenho se agravou nos últimos anos, com comprometimento da comunicação (disartria), praxias e coordenação (ataxia leve), não acompanhada de tremores.

Apesar da variabilidade de sinais clínicos da FXTAS, a maioria dos pacientes apresenta a ataxia ou o tremor intencional como principal

sintoma; no entanto, estudos mostraram casos em que o principal sinal era o comprometimento cognitivo. Mothersead e col. (2005) relataram um caso atípico, um homem com pré-mutação - (CGG)₉₃ apresentando demência de progressão rápida, tremores, ataxia e alterações de substância branca. Outro estudo descreveu um paciente com (CGG)₈₅ em que o principal sinal clínico era o declínio cognitivo com rápida progressão, enquanto as alterações motoras eram menos graves e permaneceram inalteradas; a neuroimagem foi característica de FXTAS (Gonçalves *et al.*, 2007). Fatores que pudessem estar contribuindo para o predomínio de declínio cognitivo nesses casos não ficaram claros.

A análise do gene *FMR1* de III-1 identificou um alelo com mutação completa - (CGG)_{>200} e outro normal, com (CGG)₂₉. Uma vez que já foram relatados na literatura indivíduos com FXTAS que apresentavam a mutação completa desmetilada (Loesch *et al.*, 2012), foi realizada a análise da metilação da repetição (CGG)_n, verificando-se que o alelo mutado estava completamente metilado, como ocorre na quase totalidade dos casos. Dessa forma, a hipótese diagnóstica de FXTAS não se sustentou, uma vez que ela não apresentava pré-mutação ou alelo desmetilado em *FMR1*. Desta forma, a etiologia da síndrome demencial de III-1 não foi esclarecida. Existem, no entanto, poucos estudos a respeito do envelhecimento em mulheres com mutação completa do gene *FMR1*.

4.1.3 Neto da propósita (IV-4)

Homem com 30 anos, filho de III-1, possui deficiência intelectual grave e características comportamentais típicas de SXF, tais como falta de sustento do olhar, hiperatividade e estereotipias motoras. Frequentou a APAE durante muitos anos; não aprendeu a ler nem a escrever. Nele foi identificada mutação completa - (CGG)_{>200}, estabelecendo-se o diagnóstico de SXF.

4.1.4 Demais indivíduos da família

O teste para X frágil mostrou que III-4, III-6, III-8 e IV-13 não têm alteração no gene *FMR1* (**Fig. 3**). Nas mulheres III-2, III-3, III-5, IV-2 e IV-6, foram detectadas mutações completas, o que explica a presença de dificuldade de aprendizado.

Os resultados da análise do gene *FMR1* na Família 1 estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Análise da repetição (CGG)_n do gene *FMR1* na Família 1

Indivíduo (Heredograma Fig. 3)	Idade (em anos)	Sexo	(CGG) _n	RESULTADO
II.1	81	Feminino	33/112	Pré-mutação
III.1	59	Feminino	29/ >200	Mutação completa
III.2	57	Feminino	29/ >200	Mutação completa
III.3	55	Feminino	29/ >200	Mutação completa
III.4	52	Feminino	29/33	Normal
III.5	51	Feminino	29/ >200	Mutação completa
III.6	49	Feminino	29/33	Normal
III.8	43	Feminino	29/33	Normal
IV.1	34	Feminino	29/45	Normal
IV.2	33	Feminino	45/ >200	Mutação completa
IV.4	30	Masculino	>200	Mutação completa
IV.6	32	Feminino	29/ >200	Mutação completa
IV.13	31	Masculino	29	Normal

4.1.5 Aconselhamento genético para a Família 1

O aconselhamento genético foi feito para esclarecer as informações a respeito de todas as doenças associadas ao gene *FMR1*. A família foi orientada a conversar com os outros parentes que não participaram da pesquisa, principalmente aqueles para quem foi relatada dificuldade de aprendizado, a respeito da síndrome do X frágil e sobre a importância da análise molecular do gene *FMR1*.

A neta IV-2 foi orientada a informar seus filhos a respeito da mutação do gene presente na família e do teste do gene *FMR1* para identificar portadores, quando tivessem maturidade para entender as implicações

do resultado. Além disso, as netas IV-2 e IV-6 foram informadas quanto ao risco de futuros filhos com SXF.

Relatórios sobre os resultados dos exames e o aconselhamento genético foram entregues aos participantes ou seus responsáveis.

4.2 Família 2 (Fig. 5)

Figura 5: Heredograma da Família 2.

4.2.1 Propósito (Fig. 5; I-1)

O propósito, um homem de 58 anos, em consulta no CEGH-CEL, relatou que começou a apresentar desequilíbrio havia nove anos, derrubando objetos e caindo com facilidade. Era capaz de andar apenas com apoio, tendo piora na articulação da fala; a família não o considerava como tendo declínio cognitivo, uma vez que ele mantinha a capacidade de ler e de fazer contas. Com quatro anos de escolaridade, trabalhou em atividade agrícola, estando aposentado havia seis anos por

invalidez. Tinha história de consumo abusivo de álcool por muitos anos. A ressonância magnética de crânio mostrou atrofia cerebelar leve.

Sua mãe faleceu aos 72 anos de idade e seu pai, antes do seu nascimento; não manteve contato com a família paterna, o que impossibilitou a obtenção de mais informações sobre a história familiar. Possui uma única filha e três netos, dois dos quais relatados como tendo dificuldade de aprendizado.

Ao exame neurológico, observou-se:

- a) Declínio cognitivo com fluência verbal diminuída;
- b) Dispraxia da marcha, ideativa e ideamotora, com dificuldade em realizar movimentos alternados;
- c) Ataxia leve, com alargamento da base de sustentação;
- d) Marcha realizada com passos pequenos, sem movimentos associados e leve tremor de atitude e de repouso.

A análise do gene *FMR1* mostrou a presença de pré-mutação – (CGG)₆₂, no propósito (Tabela 5; pág. 48). Foi feita nova avaliação física e também realizado teste neurocognitivo, considerando os critérios diagnósticos de FXTAS. (Tabela 2; pág. 24).

A reavaliação neurológica, realizada dois anos após a primeira consulta, mostrou claro agravamento de seu desempenho mostrando:

- a) Síndrome cerebelar, com ataxia axial e apendicular com seguimento sacádico e sacádicas hipométricas;
- b) Tremor intencional, cefálico e titubeio;
- c) Síndrome demencial grave, com MoCA de 5/30, acompanhado de sinais de frontalização (Grasping e groping presentes e reflexos axiais da face vivos);
- d) Síndrome parkinsoniana, com sinal da roda denteada, bradicinesia e rigidez; paralisia do supranuclear;
- e) Disfagia e disartria.

Portanto, seguindo os critérios diagnósticos, o propósito recebeu diagnóstico provável de FXTAS, pois apresentava dois sinais clínicos principais: tremor intencional e ataxia cerebelar.

Chama a atenção a idade relativamente precoce da manifestação de sinais clínicos, especialmente considerando-se o tamanho da repetição da pré-mutação presente no propósito, uma vez que na literatura, os sintomas de FXTAS foram observados em 17% dos homens com pré-mutação aos 50-59 anos, em 38%, aos 60-69 anos, em 47%, aos 70-79 e em 75% aos ≥ 80 anos (Jacquemont *et al.*, 2004b); além disso, os alelos maiores do que aproximadamente 70 repetições são mais prováveis de levar à FXTAS (Jacquemont *et al.*, 2006). Alguns casos semelhantes, entretanto, já foram descritos (Hagerman & Hagerman, 2007a). Um dos fatores que pode ter influenciado o início de FXTAS foi o consumo prolongado de bebida alcoólica, relatado pela filha do propósito, e que já foi associado a rápida deterioração neurológica em FXTAS (Muzar *et al.*, 2014b).

4.2.2 Primogênita do propósito (II-1)

Mulher, 31 anos, assintomática e portadora obrigatória de pré-mutação, o que foi confirmado pelo teste do gene *FMR1*, que identificou um alelo normal (CGG)₂₆ e um pré-mutado (CGG)₆₂.

4.2.3 Netos do propósito (III-1 e III-3)

Foi relatado que o neto mais velho (III-1), então com 16 anos, possuía dificuldade de aprendizado; nele foi identificada uma pré-mutação - (CGG)₆₅, o que não explica essa dificuldade de aprendizado.

No outro neto (III-3), com 5 anos de idade, foram identificados dois alelos com (CGG)₄₉ e (CGG)₆₄. Como sua mãe possui alelos com (CGG)₂₉ e (CGG)₆₂, o alelo com (CGG)₄₉ deve ter resultado de contração do alelo pré-mutado. O exame cromossômico revelou cariótipo normal (46,XY), excluindo a possibilidade de síndrome de Klinefelter e indicou, portanto, tratar-se de mosaicismo de pré-mutação e alelo intermediário (*gray-zone*), com origem pós-zigótica. Contrações da repetição (CGG)_n de pré-mutações e mutações completas do gene *FMR1* ocorrem devido

a sua instabilidade, relacionada à ausência de interrupções AGG na repetição $(CGG)_n$ ou à presença dessas interrupções em pequeno número (Mingroni-Netto *et al.*, 1996; Finucane *et al.*, 2012). Entretanto, não encontramos relato da presença de alelo intermediário associado a pré-mutação, em um mesmo indivíduo.

4.2.4 Demais indivíduos

Foi realizado o teste molecular para X frágil na esposa (I-2) do propósito, pois foi relatada menopausa precoce. No entanto, o teste identificou dois alelos normais – $(CGG)_{26}$ e $(CGG)_{28}$, sendo descartada a possibilidade de FXPOI.

A realização do teste molecular para X frágil não identificou alterações na neta (III-2) do propósito. Portanto, a dificuldade de aprendizado, relatada por sua mãe, não se deve a mutação do gene *FMR1*.

Os resultados da análise do gene *FMR1* na Família 2 estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Análise da repetição $(CGG)_n$ do gene *FMR1* na Família 2

Indivíduo (Heredograma Fig. 5)	Idade (em anos)	Sexo	$(CGG)_n$	RESULTADO
I-1	58	Masculino	62	Pré-mutação
I-2	54	Feminino	26/28	Normal
II-1	32	Feminino	26/62	Pré-mutação
III-1	16	Masculino	65	Pré-mutação
III-2	11	Feminino	26/30	Normal
III-3	5	Masculino	49/64	Mosaicismo: intermediário/ pré- mutação

4.2.5 Aconselhamento genético para a Família 2

A síndrome do X frágil (SXF) é bem conhecida como a causa mais frequente de deficiência intelectual herdada; já a FXTAS e as outras doenças associadas à pré-mutação do gene *FMR1* são bem menos

consideradas como hipótese diagnóstica. O diagnóstico de FXTAS e dessas outras doenças é mais frequentemente feito a partir da identificação de indivíduos que apresentam a síndrome do X frágil, raramente os afetados sendo os casos-índice. Entretanto, o diagnóstico das síndromes associadas à pré-mutação do gene *FMR1*, em famílias em que não ocorreu a síndrome do X frágil, como a família em questão, é importante para o aconselhamento genético quanto à ocorrência de deficiência intelectual.

A análise molecular do gene *FMR1* no propósito foi um teste preditivo para sua filha (II-1) em relação às doenças associadas à pré-mutação do gene *FMR1*, pois ela obrigatoriamente herdou um alelo com a pré-mutação. Portanto, foram dadas informações quanto à FXTAS e também foi realizado o aconselhamento reprodutivo, informando o risco de FXPOI e o risco de mutação completa em sua futura prole e a ocorrência da SXF.

Os menores III-1 e III-2 foram testados por conta da dificuldade de aprendizado relatada pela mãe, já o indivíduo III-4 foi testado a pedido da mãe. O teste para X frágil em crianças assintomáticas traz riscos e benefícios. Ao se testar uma menina, é preciso esclarecer aos responsáveis as implicações do teste: quando o resultado é de pré-mutação, é preciso orientar quanto ao risco de expansão na futura prole, à ocorrência de SXF e quanto às doenças de manifestação tardia associadas à pré-mutação do gene *FMR1*; quando o resultado é de mutação completa, além do risco de SXF em crianças que venha a ter, é preciso orientação para evitar estigmatizar a criança e associar qualquer comportamento inadequado com a mutação; assim, deve-se considerar limitar a divulgação da informação de que a menina possui a mutação completa. Quando o teste é realizado em meninos assintomáticos há a possibilidade de o resultado ser de alelo pré-mutado ou alelo normal, não sendo um teste necessário para o aconselhamento reprodutivo, uma vez que não há risco significativo de futura prole com SXF. Por outro lado, a identificação de pré-mutação é preditiva para FXTAS, com risco alto, não tendo sido dada a oportunidade de essa pessoa decidir sobre submeter-se ou não ao teste. Assim, com relação a criança clinicamente

normal, consideramos o adequado transmitir a seus responsáveis, inclusive por escrito, a informação sobre a probabilidade de ela ser portadora do gene *FMR1* alterado, os riscos reprodutivos e as doenças de manifestação tardia associadas ao gene *FMR1*, mostrando a importância de comunicar-lhe o resultado do teste alterado quando ela atingir maturidade para entendê-lo, com a indicação de então consultar geneticista.

Relatórios sobre os resultados dos exames e o aconselhamento genético foram entregues aos participantes ou seus responsáveis.

5. CONCLUSÕES

1. Tendo em vista a sua variada apresentação fenotípica, a possibilidade de uma condição associada ao gene *FMR1* deve ser considerada frente a diversos fenótipos: deficiência intelectual, dificuldade de aprendizado, falência ovariana prematura e síndrome de tremor-ataxia associada ao X frágil.
2. Nas duas famílias aqui investigadas, a obtenção de história familiar detalhada permitiu identificar outras pessoas com problemas aparentemente não relacionados, mas que poderiam fazer parte do espectro fenotípico associado ao gene *FMR1*.
3. A investigação do “topo para a base”, no qual o caso-índice é um indivíduo com FXTAS, não é frequente, uma vez que, na maioria das famílias, o diagnóstico de uma condição associada ao *FMR1* é estabelecido a partir da investigação de um indivíduo do sexo masculino com deficiência intelectual devida à síndrome do X-frágil. Isso provavelmente decorre do menor conhecimento sobre FXTAS.
4. O conhecimento das diversas faces das condições associadas ao gene *FMR1* é necessário tanto para o diagnóstico, como para o adequado aconselhamento genético das famílias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JS, Adams PE, Nguyen D, *et al.* Volumetric brain changes in females with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology* 2007;69:851–859.

Allen *et al.* Examination of reproductive aging milestones among women who carry the *FMR1* premutation. *Hum. Reprod.* 2007;22: 2142–2152.

Allingham-Hawkins DJ, *et al.* Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study – preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999;83(4):322-5.

Alvarez-Mora MI, Guitart M, Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Gabau E, Milà M. Paternal transmission of a *FMR1* full mutation allele. *Am J Med Genet Part A.* 2017;173A:2795–2797

Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril.* 1998;70(1):1-15.

Apartis E, Blancher A, *et al.* FXTAS: new insights and the need for revised diagnostic criteria. *Neurology.* 2012;79(18):1898-907.

Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. *FMR1* protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science.* 1993;262(5133):563-6.

Ashley-Koch, A.E., Robinson, H., Glicksman, A. E., Nolin, S. L., Schwartz, C. E., Brown, W. T., Turner, G. and Sherman, S. L. Examination of factors associated with instability of the *FMR1* CGG repeat. *Am J Hum Genet.* 1998;63, 776–785.

Au J, Akins RS, Berkowitz-Sutherland L, *et al.* Prevalence and Risk of Migraine Headaches in Adult Fragile X Premutation Carriers. *Clinical genetics.* 2013;84(6):546-551.

Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25.

Bourgeois JA, Seritan AL, Casillas EM, Hessel D, Schneider A, Yang Y, Kaur I, Cogswell JB, Nguyen DV, Hagerman RJ. Lifetime prevalence of mood and anxiety disorders in fragile X premutation carriers. *J Clin Psychiatry.* 2011 ;72(2):175-82.

Bowen P, Biederman B, Swallow KA. The X-linked syndrome of macroorchidism and mental retardation: further observations. *Am J Med Genet.* 1978;2(4):409-14.

Brackett DM, Qing F, Amieux PS, Sellers DL, Horner PJ, Morris DR. *FMR1* transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. *PLoS One*. 2013;8(3):e58296.

Brunberg JA, Jacquemont S, Hagerman RJ, *et al*. Fragile X premutation carrier-21. riers: characteristic MR imaging findings of adult male patients with progressive cerebellar and cognitive dysfunction. *Am J Neuroradiol* 2002; 23:1757-1766

Buijsen RA, Sellier C, Severijnen L-AW, *et al*. FMRpolyG-positive inclusions in CNS and non-CNS organs of a fragile X premutation carrier with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Acta Neuropathologica Communications*. 2014;2:162.

Buijsen RA, Visser JA, Kramer P, Severijnen EA, Gearing M, Charlet-Berguerand N, Sherman SL, Berman RF, Willemsen R, Hukema RK. Presence of inclusions positive for polyglycine containing protein, FMRpolyG, indicates that repeat-associated non-AUG translation plays a role in fragile X-associated primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31(1):158-68.

Cantú JM, Scaglia HE, González-Diddi M, Hernández-Jáuregui P, Morato T, Moreno ME, Giner J, Alcántar A, Herrera D, Pérez-Palacios G. Inherited congenital normofunctional testicular hyperplasia and mental deficiency. A corroborative study. *Hum Genet*. 1978;41(3):331-9.

Capelli LP, Gonçalves MR, Leite CC, Barbosa ER, Nitrini R, Vianna-Morgante AM. The fragile X-associated tremor and ataxia syndrome (FXTAS). *Arq Neuropsiquiatr*. 2010;68(50):791-8.

Chang MC, Decaro JJ, Zheng M, Gearing M, Shubeck L, Sherman SL, Welt CK. Ovarian histopathological and ubiquitin-immunophenotypic features in fragile X-associated primary ovarian insufficiency: a study of five cases and selected controls. *Histopathology* 2011;59 :1018–1023

Chen M, Zhao M, Lee CG, Chong SS. Identification of microsatellite markers <1 Mb from the *FMR1* CGG repeat and development of a single-tube tetradecaplex PCR panel of highly polymorphic markers for preimplantation genetic diagnosis of fragile X syndrome. *Genet Med*. 2016.

Chonchaiya W, Nguyen D, Au J, *et al*. Clinical involvement in daughters of men with fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Clinical genetics*. 2010;78(1):38-46.

Cleary JD, Ranum LP. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Hum Mol Genet*. 2013;22(R1):R45-51.

Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, *et al*. Expanded Clinical Phenotype of Women With the *FMR1* Premutation. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146A(8):1009-1016.

Collins SC, Bray SM, Suhl JA, et al. Identification of novel *FMR1* variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. *Am J Med Genet A*. 2010a;10:2512–2520.

Collins SC, Coffee B, Benke PJ, et al. Array-based *FMR1* sequencing and deletion analysis in patients with a fragile X syndrome-like phenotype. *PLoS One*. 2010b;5:e9476.

Cordeiro L, Abucayan F, Hagerman R, Tassone F, Hessler D. Anxiety disorders in fragile X premutation carriers: Preliminary characterization of probands and non-probands. *Intractable & Rare Diseases Research*. 2015;4(3):123-130.

Cornish K, Kogan C, Turk J, Manly T, James N, Mills A, Dalton A. The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition. *Brain Cogn*. 2005;57(1):53-60.

Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum Mol Genet*. 2000;9(12):1759-69.

Cronister A, Schreiner R, Wittenberger M, Amiri K, Harris K, Hagerman RJ. Heterozygous fragile X female: historical, physical, cognitive, and cytogenetic features. *Am J Med Genet*. 1991;38(2-3):269-74.

Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*. 2011;146(2):247-61.

De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*. 1993;3(1):31-5.

De Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, et al. Mental status of females with an *FMR1* gene full mutation. *American Journal of Human Genetics*. 1996;58(5):1025-1032.

Devys D1, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*. 1993;4(4):335-40.

Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*. 1996;5(8):1083-91

Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M. Regulation of synaptic

structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*. 2010;65(3):373-84.

Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, Richards CS, Ward PA, Nelson DL. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMR1* gene. *Nat Genet*. 1994;8(1):88-94

Escalante JA, Grunspun H, Frota-Pessoa O. Severe sex-linked mental retardation. *J Génét Hum*. 1971;19:137-140.

Escalante JA, Frota-Pessoa O. Retardamento mental. In: *Genética Médica* (Beçak W *et al.*), Savier, São Paulo, 1973; 300-308

Farzin F, *et al.* Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. *J Dev Behav Pediatr*. 2006;27(2 Suppl):S137-44.

Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*. 1997;17(5):1539-47.

Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, Hagerman PJ, Stenzel TT, Hadd AG, Latham GJ, Tassone F. A novel *FMR1* PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem*. 2010;56(3):399-408

Finucane B, Abrams L, Cronister A, Archibald AD, Bennett RL, McConkie-Rosell A. Genetic counseling and testing for *FMR1* gene mutations: practice guidelines of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns*. 2012;21(6):752-60. Erratum in: *J Genet Couns*. 2012;21(6):985.

Fraint A, Vittal P, Szewka A, Bernard B, Berry-Kravis E, Hall DA. New observations in the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) phenotype. *Frontiers in Genetics*. 2014;5:365.

Fryns JP, Dereymaeker A, Hoefnagels M, Volcke P, Van den Berghe H. Partial fra(X) phenotype with megalotestes in fra (X)-negative patients with acquired lesions of the central nervous system. *Am J Med Genet*. 1986;23(1-2):213-9.

Gacy AM, Goellner G, Juranić N, Macura S, McMurray CT. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell*. 1995;81(4):533-40.

Garber KB, Visootsak J, Warren ST. Fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet*. 2008;16:666–72

Gessert S, Bugner V, Tecza A, Pinker M, Kühl M. *FMR1/FXR1* and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development. *Dev Biol.* 2010;341(1):222-35.

Giraud F, Ayme S, Mattei JF, Mattei MG. Constitutional chromosomal breakage. *Hum Genet.* 1976;34(2):125-36.

Gonçalves MR, Capelli LP, Nitrini R, Barbosa ER, Porto CS, Lucato LT, Vianna-Morgante AM. Atypical clinical course of FXTAS: rapidly progressive dementia as the major symptom. *Neurology.* 2007 May 22;68(21):1864-6.

Greco CM, *et al.* Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain.* 2002;125(Pt 8):1760-71.

Greco CM, *et al.* Clinical and neuropathologic findings in a woman with the *FMR1* premutation and multiple sclerosis. *Arch. Neurol* 2008; 65: 1114-1116.

Grønskov K1, Brøndum-Nielsen K, Dedic A, Hjalgrim H. A nonsense mutation in *FMR1* causing fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2011 19(4):489-91

Hagerman RJ, Jackson C, Amiri K, Silverman AC, O'Connor R, Sobesky W. Girls with fragile X syndrome: physical and neurocognitive status and outcome. *Pediatrics.* 1992;89(3):395-400.

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

Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001;57:127–130.

Hagerman RJ. Physical and Behavioral Phenotype. In: Hagerman RJ, Hagerman PJ. *Fragile X Syndrome – Diagnosis, Treatment and Research.* 3rd ed. Baltimore: John Hopkins University Press; 2002. pp.3-109.

Hagerman RJ, *et al.* Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the *FMR1* premutation. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):1051-6.

Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome—an older face of the fragile X gene. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007a Feb;3(2):107-12.

Hagerman RJ, *et al.* Neuropathy as a presenting feature in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Am J Med Genet A*. 2007b;143A(19):2256-60.

Hagerman PJ. Current Gaps in Understanding the Molecular Basis of FXTAS. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2012;2.

Hagerman R, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the *FMR1* premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol*. 2013;12(8):786-98.

Hagerman RJ, Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome - features, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(7):403-12.

Hall DA, Howard K, Hagerman R, Leehey MA. Parkinsonism in *FMR1* premutation carriers may be indistinguishable from Parkinson disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2009;15(2):156-159.

Hall DA, O'keefe JA. Fragile X-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. *Tremor Other Hyperkinet Mov* 2012a;2:467–79.

Hall, Deborah *et al.* "Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome in *FMR1* Gray Zone Allele Carriers." *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27.2 2012b; 296–300.

Hall DA, Birch RC, Anheim M, *et al.* Emerging topics in FXTAS. *J Neurodev Disord* 2014;6:31.

Hall D, Todorova-Koteva K, Pandya S, *et al.* Neurological and Endocrine Phenotypes of Fragile X Carrier Women. *Clinical genetics*. 2016;89(1):60-67.

Hamlin A, Liu Y, Nguyen DV, Tassone F, Zhang L, Hagerman RJ. 2011. Sleep Apnea in Fragile X Premutation Carriers With and Without FXTAS. *Am J Med Genet Part B* 2011; 156:923–928.

Hamlin AA, Sukharev D, Campos L, Mu Y, Tassone F, Hessel D, Nguyen DV, Loesch D, Hagerman RJ. Hypertension in *FMR1* premutation males with and without fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(6):1304-9.

Harris SW, Hessel D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, *et al.* Autism profiles of males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard*. 2008;113(6):427-38.

Harvey J, Judge C, Wiener S. Familial X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *Journal of Medical Genetics*. 1977;14(1):46-50.

Heitz, D., Devys, D., Imbert, G., Kretz, C. and Mandel, J. L. Inheritance of the fragile X syndrome: size of the fragile X premutation is a major determinant of the transition to full mutation. *J Med Genet.* 1992;29 , 794–801.

Hessl, D. *et al.* Abnormal elevation of *FMR1* mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005;139B , 115–121.

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

Howard-Peebles PN, Stoddard GR. Familial X-Linked Mental Retardation With a Marker X Chromosome and Its Relationship to Macro-Orchidism. *Clin Genet* 1980;17 (2):125-128.

Hunsaker MR, *et al.* Widespread non-central nervous system organ pathology in fragile X premutation carriers with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and CGG knock-in mice. *Acta Neuropathol.* 2011;122(4):467-79.

Hunter J, *et al.* Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(7):1648-58.

Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yeboah K, Breg WR, Carpenter NJ, Froster-Iskenius UG, Fryns JP, Glover TW, Gustavson KH, Hoegerman SF, *et al.* Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. *Am J Med Genet.* 1991;38(2-3):400-3.

Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, *et al.* Fragile X Premutation Tremor/Ataxia Syndrome: Molecular, Clinical, and Neuroimaging Correlates. *American Journal of Human Genetics.* 2003;72(4):869-878.

Jacquemont S, Farzin F, Hall D, Leehey M, Tassone F, *et al.* Aging in individuals with the *FMR1* mutation. *Am. J. Ment. Retard.* 2004a;109:154–64

Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey MA *et al.* Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *JAMA* 2004b; 291: 460–469.

Jacquemont S, *et al.* Size bias of fragile X premutation alleles in late-onset movement disorders. *J Med Genet* 2006; 43:804–809.

Kaufmann WE, Cohen S, Sun HT, Ho G. Molecular phenotype of fragile X syndrome: FMRP, FXRPs, and protein targets. *Microsc Res Tech* 2002;57:135–144.

Kunst CB e Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* 1994;77:853– 861.

Leehey MA, Legg W, Tassone F, Hagerman R. Fibromyalgia in fragile X mental retardation 1 gene premutation carriers. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(12):2233-6.

Lehrke R. Theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic*. 1972;76(6):611-9.

Loesch DZ, Hay DA. Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. *J Med Genet*. 1988;25(6):407-14.

Loesch DZ, Kotschet K, Trost N, et al. White matter changes in basis pontis in small expansion *FMR1* allele carriers with parkinsonism. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet*. 2011;0(4):502-506.

Loesch DZ, Sherwell S, Kinsella G, Tassone F, Taylor A, Amor D, Sung S, Evans A. Fragile X-associated tremor/ataxia phenotype in a male carrier of unmethylated full mutation in the *FMR1* gene. *Clin Genet*. 2012;82(1):88-92.

Loomis EW, et al. Transcription-associated R-loop formation across the human *FMR1* CGG-repeat region. *PLoS Genet*. 2014;10(4):e1004294.

Lubs HA. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet*. 1969;21:231–44

Lugenbeel KA, Peier AM, Carson NL, Chudley AE, Nelson DL. Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of *FMR1* in fragile X syndrome. *Nat Genet*. 1995;10(4):483-5.

Maddalena A, Richards CS, McGinniss MJ, et al. Technical Standards and Guidelines for Fragile X: The First of a Series of Disease-Specific Supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. *Genet Med*. 2001;3(3):200-205.

Martin JP, Bell J. A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *Journal of Neurology and Psychiatry*. 1943;6(3-4):154-157.

Martínez-Cerdeño V, et al. Fragile X–Associated Tremor/Ataxia Syndrome in a Man in His 30s. *JAMA neurology*. 2015;72(9):1070-1073.

Mingroni-Netto RC, Rosenberg C, Vianna-Morgante AM, Pavanello R de C. Fragile X frequency in a mentally retarded population in Brazil. *Am J Med Genet*. 1990;35(1):22-7.

Monaghan KG, Lyon E, Spector EB. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2013;15(7):575-86.

Mothersead PK, Conrad K, Hagerman RJ, Greco CM, Hessler D, Tassone F. GRAND ROUNDS: an atypical progressive dementia in a male carrier

of the fragile X premutation: an example of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Appl Neuropsychol*. 2005;12(3):169-78.

Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet*. 1998;35(8):637-40.

Murray A, *et al*. Reproductive and Menstrual History of Females with Fragile X Expansions. *European journal of human genetics: EJHG* 8.4 2000;247–252.

Muzar Z, Lozano R. Current research, diagnosis, and treatment of fragile X- associated tremor/ataxia syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 2014a;3:101–9.

Muzar, Zukhrofi *et al*. Addictive Substances May Induce a Rapid Neurological Deterioration in Fragile X-Associated Tremor Ataxia Syndrome: A Report of Two Cases. *Intractable Rare Dis Res* 2014b;3(4) 162–165.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, *et al*. Expansion of the Fragile X CGG Repeat in Females with Premutation or Intermediate Alleles. *American Journal of Human Genetics*. 2003;72(2):454-464.

Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, Blatt E, Sah S, Latham GJ, Hadd AG. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet Med*. 17(5):358-64, 2015

O'Donnell WT, Warren ST. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:315-38.

O'Dwyer JP, *et al*. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome presenting in a woman after chemotherapy. *Neurology*. 2005;65(2):331-2

Oberlé *et al*. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991;252:1097

Opitz JM, Segal AT, Klove H, Mathews C, Lehrke RL. X-linked mental retardation: Study of a large kindred with 20 affected members. *J Pediatr* 1965;67: 713-714.

Partington MW, Moore DY, Turner GM. Confirmation of early menopause in fragile X carriers. *Am J Med Genet*. 1996;64(2):370-2.

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*. 1991;66(4):817-22.

Renpenning H, Gerrard JW, Zaleski WA, Tabata T. Familial Sex-Linked Mental Retardation. *Canadian Medical Association Journal*. 1962;87(18):954-956.

Richards BW, Sylvester PE, Brooker C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. *J Ment Defic Res.* 1981;25 Pt 4:253-6.

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

Rodriguez-Revenge L, Madrigal I, Pagonabarraga J, et al. Penetrance of *FMR1* premutation associated pathologies in fragile X syndrome families. *European Journal of Human Genetics.* 2009;17(10):1359-1362.

Rogers C, Partington MW, Turner GM. Tremor, ataxia and dementia in older men may indicate a carrier of the fragile X syndrome. *Clin Genet* 2003; 64:54-56.

Roy D, Lieber MR. G clustering is important for the initiation of transcription-induced R-loops in vitro, whereas high G density without clustering is sufficient thereafter. *Mol Cell Biol.* 2009;29(11):3124-33.

Santoro MR, Bray SM, Warren ST. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:219-45.

Schneider A, Johnston C, Tassone F, Sansone S, Hagerman RJ, Ferrer E, Hessel D. Broad autism spectrum and obsessive-compulsive symptoms in adults with the fragile X premutation. *Clinical Neuropsychologist.* 2016; 30(6), 929-943.

Schwartz CE, et al. Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. *Am J Med Genet.* 1994;51(4):400-2.

Sellier C, et al. Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep.* 2013;3(3):869-80.

Seritan AL, Bourgeois JA, Schneider A, Mu Y, Hagerman RJ, Nguyen DV. Ages of Onset of Mood and Anxiety Disorders in Fragile X Premutation Carriers. *Current psychiatry reviews.* 2013;9(1):65-71.

Sherman SL: Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 97: 189–194.

Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med.* 2005;7(8):584-7.

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

Snow K, Tester DJ, Kruckeberg KE, Schaid DJ, Thibodeau SN. Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum Mol Genet.* 1994;3(9):1543-51.

Snyder RD, Robinson A. Recessive sex-linked mental retardation in the absence of other recognizable abnormalities. Report of a family. *Clin Pediatr (Phila).* 1969;8(11):669-74.

Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP *et al.* Association of *FMR1* repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 2005; 20: 402–412.

Summers SM, Cogswell J, Goodrich JE, *et al.* Prevalence of Restless Legs Syndrome and Sleep Quality in Carriers of the Fragile X Premutation. *Clinical genetics.* 2014;86(2):181-184.

Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science.* 1977b;197(4300):265-6. PubMed PMID: 877551.

Sutherland GR. Marker X chromosomes and mental retardation. *N Engl J Med.* 1977a;296(24):1415.

Sutherland GR, Ashforth PL. X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq 27 or 28. *Hum Genet.* 1979;48(1):117-20.

Tassone F, Hagerman RJ, Loesch DZ, Lachiewicz A, Taylor AK, Hagerman PJ. Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of *FMR1* messenger RNA. *Am J Med Genet.* 2000a;94(3):232-6.

Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. Elevated levels of *FMR1* mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000b;66(1):6-15.

Tassone F, *et al.* CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(4):566-9.

te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002;8(2):141-54.

Timchenko L. Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2280-7.

Todd PK, *et al.* CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron.* 2013 May 8;78(3):440-55. Epub 2013 Apr 18. Erratum in: *Neuron.* 2013;79(2):402.

Turner G, Eastman C, Casey J, McLeay A, Procopis P, Turner B. X-linked mental retardation associated with macro-orchidism. *Journal of Medical Genetics*. 1975;12(4):367-371.

Turner G, Till R, Daniel A. Marker X chromosomes, mental retardation and macro-orchidism. *N Engl J Med*. 1978;299(26):1472.

Verheij C1, *et al*. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*. 1993; 24;363(6431):722-4.

Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, *et al*. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905–14

Vianna-Morgante AM, Armando I, Frota-Pessoa O. Escalante syndrome and the marker X chromosome. *Am J Med Genet*. 1982;12(2):237-40.

Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pares AS, Verreschi IT. FRAXA permutation associated with premature ovarian failure. *Am J Med Genet*. 1996;64(2):373-5.

Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pavanello RCM, Mingroni-Netto RC. Premature ovarian failure (POF) in Brazilian fragile X carriers. *Genet Mol Biol*. 1999;22(4):471-4

Winarni TI, Chonchaiya W, Sumekar TA, *et al*. Immune-mediated Disorders among Women Carrier of Fragile X Premutation Alleles. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;0(10):2473-2481.

Wöhrle D, Hennig I, Vogel W, Steinbach P. Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nat Genet* 1993;4:140– 142.

Wöhrle D, Salat U, Hameister H, Vogel W, Steinbach P. Demethylation, Reactivation, and Destabilization of Human Fragile X Full-Mutation Alleles in Mouse Embryocarcinoma Cells. *American Journal of Human Genetics*. 2001;69(3):504-515.

Yu *et al*. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;252:1179

Zeesman S, Zwaigenbaum L, Whelan DT, Hagerman RJ, Tassone F, Taylor SA. Paternal transmission of fragile X syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004;129A(2):184-9.

Zhong N, Yang W, Dobkin C, Brown WT. Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet*. 1995;57(2):351-61.

7. APÊNDICE

7.1 Apêndice A – Teste MoCA

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Versão Experimental Brasileira

Nome: _____
Escolaridade: _____
Sexo: _____

Data de nascimento: ____/____/____
Data de avaliação: ____/____/____
Idade: ____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos	
				☐ Contorno ☐ Números ☐ Ponteiros		___/5	
NOMEAÇÃO							
						___/3	
MEMÓRIA Leia a lista de palavras, o sujeito de repeti-la, faça duas tentativas. Evocar após 5 minutos.		Rosto 1ª tentativa: _____ 2ª tentativa: _____	Veludo 1ª tentativa: _____ 2ª tentativa: _____	Igreja 1ª tentativa: _____ 2ª tentativa: _____	Margarida 1ª tentativa: _____ 2ª tentativa: _____	Vermelho 1ª tentativa: _____ 2ª tentativa: _____	Sem Pontuação
ATENÇÃO Leia a sequência de números (1 número por segundo).		O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [] 7 4 2				___/2	
Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros.		[] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				___/1	
Subtração de 7 começando pelo 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65 4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto						___/3	
LINGUAGEM Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. []		O gato sempre se esconde embaixo do sofá quando o cachorro está na sala. []				___/2	
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [] _____ (N ≥ 11 palavras)						___/1	
ABSTRAÇÃO Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [] trem - bicicleta [] relógio - régua						___/2	
EVOCAÇÃO TARDIA Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto []	Veludo []	Igreja []	Margarida []	Vermelho []	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS
OPCIONAL Pista de categoria _____ Pista de múltipla escolha _____							
ORIENTAÇÃO [] Dia do mês [] Mês [] Ano [] Dia da semana [] Lugar [] Cidade						___/6	
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmiento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP-SP 2007)						TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade ___/30	